Totalsynthese des Peptidantibiotikums Alamethicin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heribert Schmitt
aus Frankfurt am Main

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Totalsynthese des Peptidantibiotikums Alamethicin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heribert Schmitt
aus Frankfurt am Main

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 1983

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

sic equidem ducebam animo rebarque futurum
tempora dinumerans, nec me mea cura fefellit

Vergil, Aeneis VI, 690-691

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Günther Jung

in der Zeit von Oktober 1979 bis März 1983 im Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. G. Jung danke ich herzlich für die Themenstellung, für sein stetes Interesse an der Arbeit und für viele wertvolle Anregungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0026

Abstract

Schmitt, Heribert:

TOTALSYNTHESE DES PEPTIDANTIBIOTIKUMS ALAMETHICIN

Durch klassische Peptidsynthese wurden 150 mg des amphiphilen Eikosapeptids Alamethicin F-30 in sehr reiner Form dargestellt. Dieses vor allem wegen seiner membranmodifizierenden Eigenschaften interessante Polypeptid Ac-Aib-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib_2-Glu-Gln-Phl, das die ungewöhnliche, sterisch gehinderte α-Aminoisobuttersäure (Aib, 2-Methylalanin) sowie den Aminoalkohol Phenylalaninol (Phl) enthält, wurde durch DCC/HOBt- bzw. Mischanhydridkupplungen über die Segmente 2-11 und 12-20 aufgebaut. Die Zwischenprodukte wurden neben den üblichen Charakterisierungen eingehend ^{13}C-NMR-spektroskopisch und z.T. durch Circulardichroismus charakterisiert.

Röntgenstrukturanalysen der Pentapeptidsäure Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OH und des Nonapeptids Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl erwiesen sich nicht nur als sehr interessant wegen der 3_{10}-/α-helikalen Sekundärstrukturen von Aib-Peptiden, sondern bestätigten zugleich die gelungene Synthese eines Großteils des Moleküls.

Alle Analysenergebnisse sowie Konformationsuntersuchungen des synthetischen Alamethicins sind in voller Übereinstimmung mit der Hauptkomponente F-30 des aus Trichoderma viride isolierten Peptidantibiotikums.

Synthetisches Alamethicin zeigt bei Einzelporen-Messungen in Lipid-Doppelschichtmembranen eine außerordentliche Homogenität der fluktuierenden Leitwertniveaus, die bislang wegen der Mikroheterogenität des natürlichen Alamethicins nie erreicht werden konnte.

Die Tests auf antibiotische Eigenschaften gegen Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus zeigten im Plattendiffusionstest eine identische Wirkung von natürlichem und synthetischem Alamethicin F-30.

UNIV. LINDEN

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1
1.	Primärstruktur des Alamethicins	1
2.	Die helikale Sekundärstruktur	6
3.	Membranmodifizierende Eigenschaften	8
4.	Problemstellung	12
B.	PEPTIDSYNTHESEN	14
1.	Syntheseplan	14
1.1.	Ursprüngliche Strategie für den Aufbau des C-Terminus'	14
1.2.	Syntheseschema des Alamethicins	19
2.	Darstellung der Segmente A-D	22
2.1.	Synthese von Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl (Boc-18-20, Segment A)	22
2.2.	Synthese von Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH (Boc-12-17-OH, Segment B)	23
2.3.	Synthese von Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe (Boc-7-11-OMe, Segment C)	26
2.4.	Synthese von Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OH (Boc-2-6-OH, Segment D)	27
3.	Darstellung der Alamethicinvorstufe Boc-Pro^2-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly^{11}-Leu^{12}-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl^{20} (Boc-2-20)	28
3.1.	Synthese von Boc-12-20 (Segmente A+B)	28
3.2.	Synthese von Boc-2-11-OH (Segmente C+D)	29
3.3.	Segmentkondensation zu Boc-2-20	30
4.	Darstellung und Reinigung von Alamethicin F-30	30
5.	Vergleich mit bisherigen Alamethicin-Synthesen	35

C.	^{13}C-NMR-SPEKTROSKOPIE	41
1.	^{13}C-NMR-Spektren der Di- und Tripeptide	42
2.	Spektren der Tetra- bis Hexapeptide	49
3.	Spektren der Hepta- bis Dekapeptide	56
4.	Spektren von Boc-2-20 und Alamethicin F-30	62
D.	KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN	75
1.	Röntgenstrukturanalysen	75
1.1.	Kristallstruktur von Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH	78
1.2.	Kristallstruktur von Boc-Val-Aib-Aib-OMe	81
1.3	Kristallstruktur von Boc-Pro-D-Val-OH	81
1.4.	Kristallstruktur von Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl (Boc-12-20)	83
2.	Circulardichroismus (CD)	88
2.1.	CD von Peptiden	88
2.2.	CD-Spektren	90
E.	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT UND MEMBRANMODIFIZIERENDE WIRKUNG	95
1.	Spannungsabhängige Porenbildung in planaren Lipid-Doppelschichtmembranen	95
2.	Antibiotische Eigenschaften	100
3.	Stimulation der Guanylat-Cyclase aus Paramecium	103
F.	EXPERIMENTELLER TEIL	106
1.	Chemikalien und Methoden	106
2.	Darstellung der Aminosäurederivate	108
3.	Darstellung der Di- und Tripeptide	108
4.	Darstellung der längeren Peptide	119

G. ZUSAMMENFASSUNG 131

H. LITERATURVERZEICHNIS 134

ABKÜRZUNGEN

Aib	α-Aminoisobuttersäure, 2-Methylalanin
ALA	Alamethicin
ASA	Aminosäureanalyse
cGMP	Guanosin-3',5'-cyclomonophosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DCHA	Dicyclohexylammonium-
DMF	Dimethylformamid
EE	Essigester
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HAc	Eisessig
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
MeOH	Methanol
NMM	N-Methylmorpholin
oxaz	Oxazol(in)on
PE	Petrolether
Phl	L-Phenylalaninol
RT	Raumtemperatur
TDM	4,4'-bis-(dimethylamino)diphenylmethan
Tos	Tosylat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Die Abkürzungen für die Aminosäuren und deren Schutzgruppen entsprechen den IUPAC-Regeln [Eur. J. Biochem. 27, 201-207 (1972) und 74, 1-6 (1977)]. Bei optisch aktiven Aminosäuren bedeutet das Symbol zugleich die L-Konfiguration.

A. EINLEITUNG

Das Phänomen der elektrischen Erregbarkeit biologischer Membranen ist in seinem molekularen Ablauf noch wenig verstanden. Die physikalische Voraussetzung für das Phänomen "Erregbarkeit" ist eine spannungsabhängige Ionenleitfähigkeit der Membran. Zu den am intensivsten untersuchten spannungsabhängigen Ionophoren gehört das vom Fadenpilz Trichoderma viride gebildete Polypeptidantibiotikum Alamethicin. Die Gründe für dieses besondere Interesse an Alamethicin liegen nicht nur in den einzigartigen Leitfähigkeitseigenschaften, sondern auch in der Überschaubarkeit eines "kleinen" Moleküls, das sich mit einer Molmasse von etwa 2000 im Vergleich zu ionentransportierenden Proteinen wie EIM (Excitability Inducing Material) oder Hämocyanin sehr bescheiden ausnimmt.

Die Fähigkeit des Alamethicins, in Abhängigkeit einer angelegten Spannung Poren zu bilden, ist grundlegend zu unterscheiden von zwei anderen Arten des Ionentransports: Ionophore vom Typ des Valinomycins schleusen als Carrier einzelne komplexierte Ionen durch die Membran und ein Ionophor wie Gramicidin A bildet ohne Spannungsabhängigkeit durch Dimerisierung einen Kanal konstanten Durchmessers.

Demgegenüber induziert Alamethicin eine Leitfähigkeit, die exponentiell von der angelegten Spannung abhängt und in der gleichen Größenordnung liegt wie die Erregbarkeit von Nervenmembranen. Messungen bei sehr niedrigen Alamethicin-Konzentrationen zeigen eine unselektive Einzelpore, die verschiedene diskrete Leitwerte annehmen kann.

1. Primärstruktur des Alamethicins

Das Peptidantibiotikum Alamethicin wurde 1967 von Meyer und Reusser [1] aus dem Kulturmedium des Fadenpilzes Trichoderma

viride isoliert. Die Entdeckung von Mueller und Rudin [2], daß Alamethicin zusammen mit Protamin in bimolekularen Lipidmembranen Aktionspotentiale hervorrufen kann, erweckte für das Alamethicin ein großes Interesse.

Außer einem Glutaminsäure- und zwei Glutaminresten besteht die Alamethicinsequenz nur aus unpolaren Aminosäuren. Besonders auffallend ist der hohe Gehalt an der ungewöhnlichen Aminosäure 2-Methylalanin (α-Aminoisobuttersäure, Aib).

Payne et al. [3] bestimmten an Hand von Partialhydrolysaten die Aminosäuresequenz. Wegen des Fehlens einer freien Amino- und einer zweiten Carboxygruppe schlugen sie eine cyclische Struktur vor, die von Ovchinnikov et al. [4] massenspektrometrisch bestätigt wurde. Demnach sollte es sich um ein 18-Peptid* handeln (Abb. A.1a).

a) Payne et al. [3]:

Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-
Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln

b) Martin und Williams [10]:

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-

                              14  15  16  17  18      19
                              Pro-Val-Aib-Aib-Glu(Phl)-Gln
```

c) Alamethicin F-30:

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib

                              14  15  16  17  18  19  20
                              Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl
```

Abb. A.1: Strukturvorschläge für Alamethicin F-30

---

* Bei Polypeptiden wird zur leichteren Lesbarkeit diese von Bodanszky [5] vorgeschlagene Nomenklatur verwendet.

Zwei Versuche, diese Struktur durch Synthese zu bestätigen, scheiterten an der Reaktionsträgheit der sterisch gehinderten α-Aminoisobuttersäure [6,7].

Nach der Entdeckung des Aminoalkohols L-Phenylalaninol durch G. Jung et al. [8,9] und Martin und Williams [10] sowie durch den Nachweis der N-terminalen Acetyl-Aib-Gruppe [10] wurde der Ionophor als offenkettiges Molekül erkannt.

1977 gelang eine Darstellung der von Martin und Williams vorgeschlagenen Struktur (Abb. A.1b): Gisin et al. [11] berichteten von der Synthese eines Alamethicins, welches an der vorletzten Aminosäure Glu^{18} das γ-verknüpfte Phenylalaninol trug. Durch Kombination von Merrifieldsynthese und Segmentkondensation hatten sie ein Polypeptid mit "alamethicin-ähnlicher" Aktivität erhalten, das jedoch offensichtlich nicht mit natürlichem Alamethicin identisch war.

Durch Vergleich der pK-Werte der Carboxy-Gruppen von Glu-Gln-Modellpeptiden mit dem des natürlichen Alamethicins wurde noch 1977 von Gisin et al. [12] die lineare Struktur mit durchgehender α-Verknüpfung und C-terminalem Phenylalaninol erkannt (Abb. A.1c). Zu der gleichen Struktur gelangten auch Pandey et al. [13] aufgrund von massenspektrometrischen Ergebnissen.

Nach drei im Jahre 1981 erschienenen Synthesen des Alamethicins F-30 (s. Abschn. B.5.) [14-16] kann diese Struktur als sicher gelten. Strenggenommen stellt diese Primärstruktur nur die Hauptkomponente des von Trichoderma viride produzierten Antibiotikums dar.

In natürlichem Alamethicin (Upjohn Comp.) sind durch HPLC bis zu 12 Komponenten [15] detektierbar. Meist unterscheiden sich die Komponenten nur durch die Substitution eines Aminosäurerests. Diese Mikroheterogenität ist eine Folge der relativ unspezifischen enzymatischen, also nicht-ribosomalen Biosynthese des Alamethicins [17].

Das von Irmscher und Jung [18] als Hauptkomponente isolierte Alamethicin-Analogon F-50 weist in Position 18 Glutamin anstelle der Glutaminsäure auf.

Partialhydrolysate dieses Alamethicins F-50 wurden von König und Aydin [19] derivatisiert und mittels GC/MS sequenziert. Abbildung A.2 zeigt die ermittelten Austauschstellen:

```
     1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-
                (Aib Ala Aib)       (Aib)

 14  15  16  17  18  19  20
Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phl
       (Val Val)
```

Abb. A.2: Mikroheterogenität des Alamethicins F-50

Von Mikroorganismen der Klasse Ascomycetes-Deuteromycetes wird außer Alamethicin noch eine ganze Reihe von strukturell sehr nahe verwandten Polypeptiden produziert, die sich alle durch Anwesenheit von Aib auszeichnen. In manchen von ihnen findet man darüber hinaus noch die nächst höhere homologe α-Dialkylaminosäure: D-Isovalin (D-Iva, (R)-2-Ethylalanin) [20]. Alle diese Peptidantibiotika besitzen außerdem einen C-terminalen Aminoalkohol (L-Phenylalaninol, L-Valinol bzw. L-Leucinol). Von Toniolo et al. wurde für diese Klasse von Peptiden daher die Bezeichnung "Peptaibol"-Antibiotika [21] vorgeschlagen. Ein weiteres Charakteristikum ist der acetylierte N-Terminus. Eine Übersicht bieten Jung et al. [22] und Toniolo et al. [21] (s. Abb. A.3).

Alamethicin F-30/50:

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl
             (Aib Ala Aib)       (Aib)                        (Val Val Gln)
```

Suzukacillin A [57]:

```
Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Iva-Glu-Gln-Phl
                      (Aib)       (Leu)                            (Aib Gln)
```

Trichotoxin A-40 [56]:

```
Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Glu-Valol
      (Ala)                       (Ala)                        (Aib)
```

Antiamoebin [20]:

```
Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pro-Phl
                                                  (Pro)
```

Emerimicin III/IV [20]:

```
Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Ala-Phl
                                                      (Aib)
```

Hypelcin [127]:

```
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Leuol
```

Zervamicin IA [128]:

```
Ac-Trp-Ile-Glu-Iva-Val-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Phl
```

Abb. A.3: Aminosäuresequenzen einiger "Peptaibol"-Antibiotika. Die eingeklammerten Aminosäurereste bezeichnen Austauschstellen

2. Die helikale Sekundärstruktur

Marshall [23] sowie Burgess und Leach [24] hatten Anfang der 70er Jahre berechnet, daß die zweite α-Methylgruppe im Aib zu einer drastischen Einschränkung der Konformationsfreiheiten führen muß. Nach diesen Berechnungen stehen der α-Aminoisobuttersäure im Ramachandran-Diagramm nur zwei kleine Regionen von weniger als 1 % der Gesamtfläche aller möglichen Φ/Ψ -Winkelkombinationen zur Verfügung. Diesen Wert muß man vergleichen mit 18 % für einen Alaninrest mit einer Methylgruppe weniger, bzw. mit 54 % für Glycin. Die beiden kleinen für Aib erlaubten Flächen gehöhren zur je links- und rechtshändigen α- bzw. 3_{10}-Helix.

Die Φ/Ψ -Werte für die α-Helix stimmen fast mit denen der 3_{10}-Helix überein. Der Unterschied zwischen den beiden liegt in der Verknüpfung der Wasserstoffbrückenbindungen: 10 Atome in dem durch die H-Brücke gebildeten Ring bei der 3_{10}-Helix, 13 Atome bei der α-Helix (3.6_{13}-Helix).

Die Anwesenheit von L-Aminosäuren führt wie bei Proteinen zur Ausbildung von rechtshändigen α-Helices (negative Φ/Ψ -Werte).

Ausführliche Konformationsstudien an Alamethicin in Lösung mittels Circulardichroismus (CD) [9,25] und ^{13}C-NMR-Spektroskopie [9] erwiesen einen signifikanten α-Helixgehalt, der von polaren zu lipophilen Lösungsmitteln zunimmt. Dabei wurde der N-Terminus zwischen Pro-2 und Pro-14 als das am ausgeprägtesten α-helikale Segment erkannt [26,27].

Dagegen zeigte sich in der Kristallstruktur von kleinen Aib-Peptiden immer wieder das Vorliegen von Typ III-β-Turns [28,29], deren Verlängerung nicht zu einer α-Helix, sondern zu einer 3_{10}-Helix führt [30,31]. Beispielsweise hat die Röntgenstrukturanalyse des N-terminalen Tetrapeptids Z-Aib-Pro-Aib-Ala-OMe [30] ergeben, daß dieses kurze Peptid eine

Windung einer 3_{10}-Helix bildet. Von verschiedener Seite, zuerst von Nagaraj et al. [32] war deshalb die Vermutung geäußert worden, daß im Alamethicin auch eine 3_{10}-Helix vorliegen könnte.
Wie wir bereits 1981 an der Röntgenstrukturanalyse des 11-Peptids Boc-(Ala-Aib)$_2$-Ala-Glu(OBzl)-(Ala-Aib)$_2$-Ala-OMe zeigen konnten [33,34] liegt in längeren Aib-Peptiden demgegenüber eine α-Helix vor. Dieses Undekapeptid kann aufgrund seiner alternierenden Aib-Sequenz als geeignetes Modell für den N-Terminus des Alamethicins gelten.

Kürzlich wurden diese Ergebnisse bestätigt durch die Röntgenstrukturanalyse des Alamethicins selbst [35]. Fox und Richards beschreiben die Struktur von drei in der asymmetrischen Einheit gefundenen unabhängigen Alamethicin-Molekülen. Alle drei aus Methanol/Acetonitril kristallisierten Moleküle liegen fast über die gesamte Länge als α-Helix vor, mit einem Knick in der Mitte bei Pro-14 und mit einem kurzen 3_{10}-helikalen Stück am C-Terminus, welches ein bis zwei Aminosäuren umfaßt.
Obwohl das Peptid aus fast nur lipophilen Aminosäuren besteht, zeigt das Alamethicin in seiner Kristallstruktur dennoch deutlich amphiphilen Charakter: Alle lösungsmittelzugänglichen polaren Gruppen liegen in einem schmalen Streifen an der Oberfläche parallel zur Helixachse. Dazu gehören außer den hydrophilen Seitengruppen auch die Carbonyl-Sauerstoffatome von Aib-10 und Gly-11, die wegen des Prolinknicks der α-Helix keine intramolekularen Wasserstoff-Brücken bilden.

Damit weisen sowohl theoretische wie auch experimentelle Konformationsstudien in Lösung und Kristall auf die dominierende Rolle einer starren helikalen Konformation hin. Daß es sich hier um eine Grundvoraussetzung für den Mechanismus der Porenbildung handelt, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

3. Membranmodifizierende Eigenschaften

Alamethicin zeigt antibakterielle Aktivität u.a. gegen Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus und ist antifungisch wirksam u.a. gegen Saccharomyces cerevisiae [36]. Die Wirkungen liegen im mikromolaren Bereich. Gegen Säugerzellen wurde bei Konzentrationen von etwa $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l lytische Aktivität nachgewiesen bei Erythrozyten [18], Leukozyten, Mäuse-Lymphozyten und Ratten-Mastzellen [37]. Ferner sind erwähnenswert die Hemmung der DNA-Synthese in Lymphozyten im sublytischen Bereich [37], die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung an Mitochondrien [32], die Entkopplung der Photo-Phosphorylierung an Thylakoiden aus Radieschenkeimblättern [38] sowie die Stimulation der Guanylat-Cyclase von Paramecien [39].

Die bemerkenswerteste Eigenschaft von Alamethicin ist jedoch dessen Fähigkeit zur spannungsabhängigen Ionenleitung durch künstliche und natürliche Membranen [40]. Wenn auch Versuche mit intakten biologischen Membranen [41] in Zukunft einen breiteren Raum einnehmen dürften, wurden die Leitfähigkeitseigenschaften des Alamethicins doch sehr viel detaillierter an den einfacheren und übersichtlicheren künstlichen Lipidbilayern untersucht.

Die makroskopische Leitfähigkeit einer mit Alamethicin dotierten Membran ist exponentiell von der angelegten Spannung abhängig. Sie nimmt für jede 4-6 mV um den Faktor e zu [42-44] und ist damit in der gleichen Größenordnung wie die Erregbarkeit von Nervenmembranen. Die Ionenleitfähigkeit ist zudem stark von der Alamethicinkonzentration und von der Ionenstärke des Elektrolyten abhängig [2]. Die Konzentrationsabhängigkeit in der 6. und höheren Potenz läßt auf die Beteiligung von 6-11 oder mehr Molekülen bei der Bildung einer Pore schließen. Das Auftreten von Aggregaten bei der Porenbildung ist unumstritten. Die α-Helix selbst ist außerdem viel zu schmal, als daß Ionen hindurchtreten könnten.

Bei ausreichend kleinen Antibiotikamengen und unter Festhalten einer bestimmten Gleichspannung ("voltage clamp") erhält man Stromfluktuationen, die einer Einzelpore zugeordnet werden können. Dabei treten im msec-Bereich diskrete Leitwerte der Pore auf, die keine einfachen Vielfachen voneinander sind. Die Lebensdauer der Pore liegt im sec-Bereich. Es sind bis zu 10 verschiedene, mehr oder weniger stabile Leitwerte einer Pore beobachtet worden [43,45]. Sie können zwanglos mit dem variablen Durchmesser der Pore erklärt werden. Der niedrigste Zustand ist undurchlässig für Ca^{2+} und Cl^-, die höheren lassen so sperrige Ionen wie $Tris\text{-}H^+$ (*) und $Hepes^-$ (*) passieren.

Boheim und Kolb [44] kommen durch eine Analyse der mittleren Porenleitfähigkeit und der Relaxationszeiten zu dem Schluß, daß höhere Porenzustände bei größeren Spannungen begünstigt sind, und daß jede Zustandsänderung der Pore mit dem Übergang einer Elementarladung durch die Membran verbunden ist. Der wahrscheinlichste Leitwert sowie die Lebensdauer des Zustands ist jedoch nur schwach spannungsabhängig. Die exponentielle Spannungsabhängigkeit der makroskopischen Leitfähigkeit muß eher der Anzahl der Poren zugeschrieben werden als den Eigenschaften der Einzelpore.
Wird auf einen Spannungsimpuls die Kinetik des induzierten Stroms gemessen, so zeigt sich ein Vorgang 1. Ordnung, der je nach Lipidzusammensetzung unabhängig oder schwach abhängig von der Peptidkonzentration ist [44,46]. Man schließt daraus auf einen vorgeformten oligomeren Zustand, der schon ohne angelegte Spannung existiert.

(*) Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Hepes = Histidin-N-2-hydroxymethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

Trotz der bekannten Primär- und Sekundärstruktur des Alamethicins und der intensiven Leitfähigkeitsuntersuchungen, vor allem in Bilayer-Membranen, wurde bisher kein Konsens erzielt über ein erschöpfendes Modell für die Porenbildung. Neben verschiedenen Vorstellungen [35,47,48] muß jedoch als das aussagekräftigste Modell das kürzlich von Boheim et al. [49] entwickelte Flip-Flop-Gating-Modell erwähnt werden, da es als einziges in der Lage ist, selbst subtile Details der Leitfähigkeitsmessungen zu erklären.

Die Alamethicin-Helix besitzt aufgrund ihrer geordneten CO- und NH-Gruppierungen ein Dipolmoment, welches von Schwarz und Savko [50] in Octanol auf 75 D bestimmt worden ist. Auch Yantorno et al. [51] erhielten 75 D in Ethanol/Dioxan (1:1). Wenn nun die Alamethicin-Moleküle auf der cis-Seite der Membran zugegeben werden, dann lagern sie sich unter Ausbildung der maximalen Helixlänge [9] in die Membran ein. Dabei tritt der N-terminale, lipophilere und partiell positive Pol zuerst in die Lipidphase ein in Richtung auf die trans-Seite, so daß alle partiell negativen Dipolladungen (d.h. die partiell negativ geladenen Peptidcarbonyle) zur cis-Seite gerichtet sind (Abb. A.4a).

Die elektrostatische Abstoßung der parallelen Helices bewirkt, daß nur Monomere vorliegen, die durch Lipidmoleküle voneinander getrennt sind. Dies ändert sich, wenn ein (-)-Dipol zur antiparallelen Orientierung "flippt". Nun ist ein (+)-Dipol entstanden und sofort werden sich durch Dipol-Dipol-Anziehung Aggregate bilden. Nach einiger Zeit erscheinen mehr (+)-Dipole und größere Aggregate werden gebildet, wobei das Hexamere als energetisch und sterisch begünstigt angesehen wird (Abb. A.4b).

Das Entscheidende passiert nun, wenn eine äußere Spannung angelegt wird (positives Membranpotential auf der cis-Seite): Die (+)-Dipole wechseln wieder ihre Orientierung entsprechend

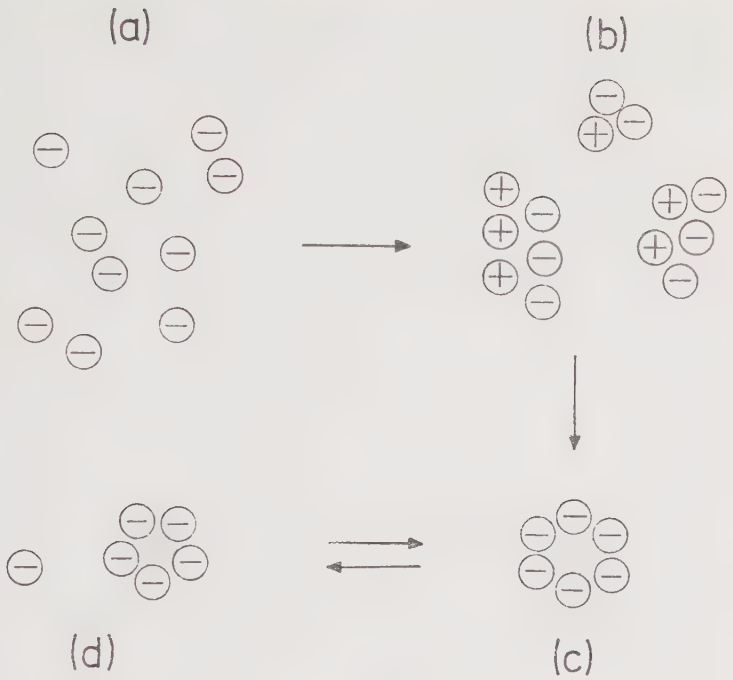


Abb. A.4: Schematische Darstellung der Porenbildung durch Alamethicin nach dem "Flip-Flop-Gating-Modell" [49]

der jetzt begünstigten Lage parallel zum elektrischen Feld: der "Flop". Innerhalb eines vorgebildeten Aggregats stoßen sich die benachbarten (-)-Dipole ab und schaffen so einen Hohlraum, eine Pore ist entstanden (Abb. A.4c). Die Pore mag auch mit lateral eindiffundierendem Lipid gefüllt werden, andererseits wird bei günstiger Anordnung der Helices wäßriger Elektrolyt eindringen. Da dieser die elektrostatische Abstoßung paralleler Helices durch seine hohe Elektri-

zitätskonstante mindestens um eine Größenordnung erniedrigt, erfährt die Pore eine gewisse Stabilisierung. Die Anordnung der porenbildenden parallelen Helices kann ein oder mehrere Moleküle aufnehmen und wieder abgeben, somit resultiert eine Pore mit variablem Durchmesser (Abb. A.4d).

Die experimentell beobachtbaren Fluktuationen der diskreten Leitwerte einer Pore spiegeln die Stabilität der einzelnen Aggregate wider, die von vielen Faktoren abhängen kann, z.B. von der Flip-Flop-Rate, der Lipidumgebung wie auch selbstverständlich von der Struktur des Ionophors.

Die genauen Vorgänge auf molekularer Basis sind noch nicht verstanden. So ist es bisher nicht möglich, die sehr unterschiedliche Stabilität von Einzelporen, d.h. die Bevorzugung bestimmter Leitwerte bei verschiedenen Peptiden zu verstehen. Während Alamethicin F-30 sehr stabile Poren bildet, konnten beispielsweise von dem in Primär- und Sekundärstruktur sehr nahe verwandten Trichotoxin A-40 nur äußerst kurzlebige Poren beobachtet werden. Andererseits besitzt Melittin, das nur aus natürlichen Aminosäuren besteht, nicht nur die Fähigkeit zur spannungsabhängigen Ionenleitung, sondern bildet auch zeitlich noch auflösbare, also "stabile" Poren [52].

4. Problemstellung

W. Mayr [27,53] konnte zwar 1979 mit Hilfe der Liquid-Phase-Methode [54] die N-terminale Alamethicin-Sequenz (1-11) als kupplungsfähiges Undekapeptidhydrazid Ac-Aib-Pro-(Aib-Ala)$_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NH-NH$_2$ einwandfrei darstellen; es mißlang jedoch die Abspaltung des C-terminalen Oktapeptids vom polymeren Träger, so daß auf eine Segmentkondensation zum Alamethicin verzichtet werden mußte. Im übrigen enthielt die Sequenz noch kein Phenylalaninol.

Erfolgreicher hatte Oekonomopulos [55] durch klassische Peptidsynthese ein vereinfachtes Analogon aus 19 Aminosäuren in hoher Reinheit dargestellt, welches zwar keine stabilen Poren bildete, aber durchaus eine spannungsabhängige Ionenleitung zeigte:
Boc-(Aib-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe.

Auf den synthetischen Erfahrungen von Oekonomopulos aufbauend - insbesondere im Umgang mit der reaktionsträgen α-Aminoisobuttersäure - ist die klassische Peptidsynthese die Strategie der Wahl, um eine Totalsynthese des Alamethicins in Angriff zu nehmen.
Folgende Ziele sollten mit einer erfolgreichen klassischen Synthese erreicht werden:

a) Darstellung der Alamethicinhauptkomponente F-30 in größtmöglicher Reinheit
b) Eine Ausbeute mindestens im 100 mg-Bereich, um ^{13}C-NMR-spektroskopische Untersuchungen zu ermöglichen
c) Isolierung und vor allem damit verbundene spektroskopische Charakterisierung möglichst vieler Partialsequenzen, um Zusammenhänge zwischen Konformation und Struktur und eventueller Wirkungsweise zu erhellen
d) Röntgenstrukturanalyse von möglichst großen kristallisierten Segmenten (Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Winter)
e) Untersuchungen der Porenbildung in Lipid-Bilayern (Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Boheim): Erstens als Identitätsbeweis des synthetischen Alamethicins, zweitens im Unterschied zu dem durch Mikroheterogenität geprägten Upjohn-Alamethicin

Der vergleichsweise hohe Arbeitsaufwand, der mit einer konventionellen Synthese verbunden ist, erscheint angesichts der Vorteile der Methode gegenüber jeder Trägersynthese zweifelsohne gerechtfertigt. Dies gilt insbesondere für das Polypeptidantibiotikum Alamethicin angesichts der großen Zahl einzubauender sterisch gehinderter Aib-Reste und einiger besonders säurelabiler Peptidbindungen.

B. PEPTIDSYNTHESEN

1. Syntheseplan

1.1. Ursprüngliche Strategie für den Aufbau des C-Terminus'

Läßt man Trifluoressigsäure 3 h bei Raumtemperatur auf die Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin oder Trichotoxin A-40 einwirken, so werden selektiv die Aib-Pro-Bindungen des Moleküls gespalten [56].

Interessanterweise erhielt man sowohl beim Alamethicin als auch bei dem in seiner Sequenz damals noch nicht gesicherten Suzukacillin das gleiche Heptapeptid* H-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl [57].

Die geplante Alamethicinsynthese sollte u.a. auch dieses Prolylpeptid als Baustein liefern, um den analytischen Befund beim Suzukacillin durch die Synthese zu bestätigen. Zum Aufbau dieses Heptapeptids sollten aus ökonomischen Gründen zunächst die beiden Aib-Reste verknüpft werden, da deren sterische Hinderung eine Segmentkondensation zwischen Aib^{16} und Aib^{17} nicht ratsam erscheinen ließ [55].

Leplawy et al. [58] hatten Tfa-Aib-Aib-OMe in hervorragender Ausbeute über das 1.3-Oxazolinon(5) dargestellt (98 %). Allerdings ist zur Ausbildung des Oxazolinons auf der Dipeptidstufe die Tfa-Schutzgruppe erforderlich (Abb. B.1).

Als Schutz der α-Carboxygruppe wählten wir generell den hydrogenolytisch abspaltbaren Benzylester, um den drastischen Verseifungsbedingungen der Aib-Methylester (40°C, 2 N NaOH)

---

* Hier wie in analogen Fällen wird zur Vereinfachung der Nomenklatur statt von einem Pseudo-Heptapeptid nur von einem Heptapeptid gesprochen. Entsprechend wird Alamethicin als 20-Peptid bezeichnet.

zu entgehen. Daher ergab sich als geplanter Dipeptidbaustein in Abänderung von Leplawy et al. Tfa-Aib-Aib-OBzl.

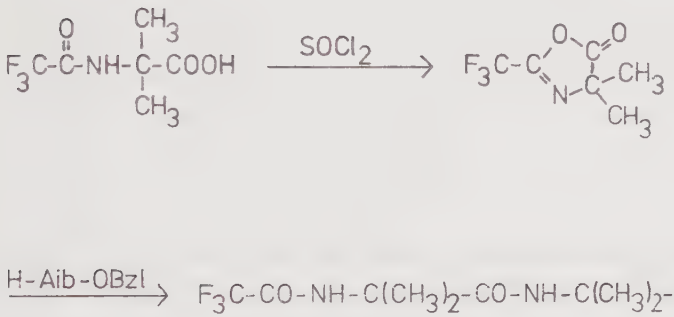


Abb. B.1: Kupplung des 1.3-Oxazolinon(5) zum Dipeptidester

Für den weiteren Verlauf schien sich die Verknüpfung dieses Aib-dipeptids mit Boc-Pro-Val-OH anzubieten, um im nächsten Schritt das kostbarere C-terminale Tripeptid H-Glu(OBzl)-Gln-Phl anzukuppeln. Für dieses Tripeptid mit dem Aminoalkohol Phenylalaninol, der nicht geschützt werden sollte, wählten wir den Benzylester als Schutz der Drittfunktion.

Für die Darstellung des C-Terminus' ergab sich somit als erste Etappe die Synthese folgender geschützter Di- und Tripeptide:
Boc-Pro-Val-OBzl, Tfa-Aib-Aib-OBzl, Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl.

Eine selektive Abspaltung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe aus Tfa-Aib-Aib-OBzl in Gegenwart des Benzylesters war zwar nicht im voraus sicher, aber auch eine gleichzeitige Abspaltung beider Schutzgruppen mit anschließender Mischanhydridkupplung in wäßriger NaOH erschien als eine Möglichkeit.

Im Verlauf der synthetischen Arbeiten konnte zwar das C-terminale Tripeptid Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl in 7 Stufen rein dargestellt werden, die geplante Darstellung des Tetrapeptids Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OH machte jedoch erhebliche Schwierigkeiten:

a) Die Synthese von Tfa-Aib-Aib-OBzl gelang zwar, aber sie erwies sich als unerwartet aufwendig. Es zeigte sich nämlich, daß die Umsetzung des extrem leicht hydrolysierbaren Tfa-Aib-Oxazolinons nur mit freiem (am besten destillierten) H-Aib-OBzl quantitativ den gewünschten Dipeptidester ergab. Schon eine leichte Verunreinigung durch das für die Bildung des Oxazolinons benötigte Thionylchlorid bewirkte eine Protonierung der Aminokomponente, der auch durch Basenzusatz nicht zu begegnen war. Das Ergebnis war in mehreren Ansätzen eine drastisch verminderte Ausbeute (< 50 %).

b) Es konnte für den Dipeptidester Tfa-Aib-Aib-OBzl keine selektive Acylgruppen-Abspaltung gefunden werden, ohne den Aib-Benzylester anzugreifen.
Auch eine reduktive Abspaltung durch $NaBH_4$ [59] brachte keinen Erfolg.

c) Bei dem Versuch, Boc-Pro-Val-OH mit H-Aib-Aib-OH nach der Mischanhydridmethode umzusetzen, zeigte sich trotz genauer Dosierung der wäßrigen Natronlauge in der aufgearbeiteten Tetrapeptidsäure ein Gehalt von D-Val in der Größenordnung von 20-30 %.

Von Boc-Pro-D-Val-OH konnten Kristalle erhalten werden; die Röntgenstrukturanalyse dieser Dipeptidsäure zeigt Abschnitt D.1.3.

Bei der Suche nach einer racemisierungsfreien Verknüpfung zeigte sich, daß auch bei der Kupplung von Boc-Pro-Val-OH mit H-Aib-OMe eine Racemisierung der gleichen Größenordnung auftritt. Eine Variation der Kupplungsbedingungen und Kupplungsmethoden (Mischanhydrid- und DCC-Methode mit und ohne Zusätze wie HOBt oder 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydrobenzotriazin bzw. die Verwendung von EEDQ und IIDQ* als Kondensationsmittel) führte zu keiner nennenswerten Senkung des D-Valingehalts, der gaschromatographisch nach Frank et al. [60] bestimmt wurde.
Demgegenüber war das Dipeptid Boc-Val-Aib-OBzl praktisch racemisierungsfrei zugänglich (Mischanhydridmethode).

Ein Ausweichen auf die Kupplung von Boc-Val-Aib-OH mit H-Aib-OMe lag nahe, da das Valylpeptid auch an anderer Stelle (Positionen 9 und 10) Verwendung finden sollte. Dieser Weg scheiterte jedoch an der schlechten Ausbeute des Tripeptids Boc-Val-Aib-Aib-OMe. Auch Shaw und Taylor [61] berichten von Ausbeuten z.T. weit unter 50 % bei der Aib-Aib-Verknüpfung.

Die unerwartete Racemisierung des Valins bei der Tripeptidbildung verlangt eine Erklärung. Der Racemisierungsgrad hängt generell von der Kupplungsmethode, von der Amino- und Carboxykomponente, sowie vom Lösungsmittel, der Temperatur, der Aktivierungszeit und der Natur der

---

* EEDQ = 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1.2-dihydrochinolin,
IIDQ = 1-Isobutyloxycarbonyl-2-isobutyl-1.2-dihydrochinolin

Base ab. Im vorliegenden Fall ist der einzig variierte Parameter die Aktivierung der Carboxykomponente. Wie Determann et al. [62] überzeugend dargelegt haben, ist die Nucleophilie einer Urethancarbonylgruppe im Vergleich zu der einer Amidcarbonylgruppe signifikant erniedrigt. In gleichem Maß ist der für die Racemisierung verantwortliche Ringschluß zum intermediären Oxazolinonring herabgesetzt, wenn es sich bei der aktivierten Carboxygruppe um eine urethangeschützte Aminosäure handelt. Wie E. Berger et al. [63] an der Mischanhydridkupplung eben dieses Dipeptids Boc-Pro-Val-OH mit H-Pro-OMe zeigten, kann schon eine Temperaturerhöhung auf $0^{\circ}C$ in DMF zu einer Racemisierungsquote von 22.9 % D-Valin führen. Wir nehmen deshalb an, daß die sterisch gehinderte α-Aminoisobuttersäure die Carboxykomponente relativ langsam angreift und so eine Oxazolinonringbildung ermöglicht.

Aufgrund der Racemisierungstendenz des aktivierten Boc-Pro-Val-OH kann man nicht ausschließen, daß auch andere aktivierte Dipeptidsäuren in einer Umsetzung mit dem Aib-Ester ein ähnliches Verhalten zeigen. Es sei darauf hingewiesen, daß Nagaraj et al. [16] in ihrer Alamethicinsynthese den Tripeptidester Boc-Gly-Leu-Aib-OMe durch Verknüpfung von Boc-Gly-Leu-OH mit H-Aib-OMe als Aminokomponente synthetisierten. Eine Angabe des D-Leucingehalts wurde nicht gemacht.

d) Eine weitere unerwartete Schwierigkeit zeigte sich bei der Verwendung der Aib-Benzylester. Bei der hydrogenolytischen Abspaltung der Benzylgruppe blieb die Hydrierung selbst unter einem erhöhten H_2-Druck von 5-10 bar nach 90-95 prozentigem Umsatz stehen. Die Peptidsäuren Boc-Pro-Aib-OH, Boc-Leu-Aib-OH und Boc-Val-Aib-OH waren daher nur durch anschließendes Auswaschen rein zugänglich. Eine Probehydrierung von Boc-Val-Aib-Aib-OBzl lieferte

nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle sogar nur etwa zu 50 % die erwartete Tripeptidsäure.

Balasubramanian et al. [15] berichten demgegenüber von keinerlei Schwierigkeiten.

Aufgrund der unter a)-d) aufgeführten Schwierigkeiten und Fehlschläge wurde der ursprüngliche Syntheseplan völlig abgeändert.

1.2. Syntheseschema des Alamethicins

Bei der Strategie der Synthese mußten zwei Gesichtspunkte im Vordergrund stehen:

(a) eine möglichst problemlose Verknüpfung der sterisch gehinderten α-Aminoisobuttersäure, und
(b) möglichst racemisierungsfreie Kupplungsschritte.

Alamethicin enthält 8 Aib-Reste, die mit Ausnahme einer Aib-Aib-Verknüpfung alle von natürlichen Aminosäuren flankiert werden. Oekonomopulos [55] hatte gezeigt, daß er Aib als Aminokomponente glatt kuppeln konnte, während die Verwendung als Carboxykomponente immerhin einer drastischen Aktivierung bedurfte. Ein Hinweis auf die sterische Hinderung bei der Aktivierung ist auch das Versagen der Azidkupplung, von dem zuerst Kendrick [6] berichtete. Die Forderung (a) wurde demnach realisiert durch die konsequente Verwendung von Aib als Aminokomponente auf der Dipeptidstufe, so daß geschützte Dipeptide vom allgemeinen Typ Boc-X-Aib-OR resultierten. Die mit konventionellen Kupplungsmethoden nur schwer erreichbare Aib-Aib-Verknüpfung wurde analog Leplawy et al. [58] mit Pivalinsäurechlorid zum Boc-Aib-Aib-OMe hergestellt.

Um die Gefahr von Racemisierungen zu unterdrücken, wurden für Segmentkondensationen jeder Größe - also auch, wenn nur

eine Dipeptidsäure als Carboxykomponente Verwendung fand - immer Aib-, Gly- bzw. Pro-Reste aktiviert. Einzige Ausnahme stellt die Verknüpfung von Ala^6- Gln^7 dar.

Das Tripeptid Boc-Val-Aib-Aib-OMe wurde auf dem einzigen racemisierungsfreien Weg mit guten Ausbeuten aus Boc-Val-OH und H-Aib_2-OMe dargestellt.

Der Aufbau des Tripeptids Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl erfolgte schrittweise vom C-Terminus her.

Die Schnittstelle für die Kupplung der Segmente 2-11 und 12-20 liegt am beweglichen Glycin, um bei der beträchtlichen Länge der Ketten wenigstens sterisch günstige Bedingungen zu schaffen.

Als letzter Schritt wurde anstelle einer möglichen Acylierung des Gesamtmoleküls die Kupplung von Ac-Aib-OH gewählt. Abbildung B.2 zeigt das Syntheseschema des Gesamtmoleküls.

Bezüglich der Taktik der Schutzgruppenwahl ist die vorliegende Sequenz wegen des geringen Seitenschutzes nicht sehr anspruchsvoll. Wir entschieden uns generell für die bewährte Kombination Boc/OMe. Benzylester sind, wie oben erwähnt, als Aib-Schutz nicht empfehlenswert.

Boc-Abspaltungen wurden bei kürzeren Peptiden mittels 1.2 N HCl/Eisessig durchgeführt. Die Hydrochloride sind in der Regel leicht zu fällen und kristallisieren gut. Bei der Entacylierung längerer Peptide wurden jedoch Nebenreaktionen beobachtet. In diesen Fällen gelang die Abspaltung mit Trifluoressigsäure/Dichlormethan (1:1) in kürzerer Zeit (5-8 min) und bedeutend sauberer. Dieser Vorteil ging jedoch oft zu Lasten der Ausbeute, da die Trifluoracetate meist nur unvollständig gefällt werden konnten.

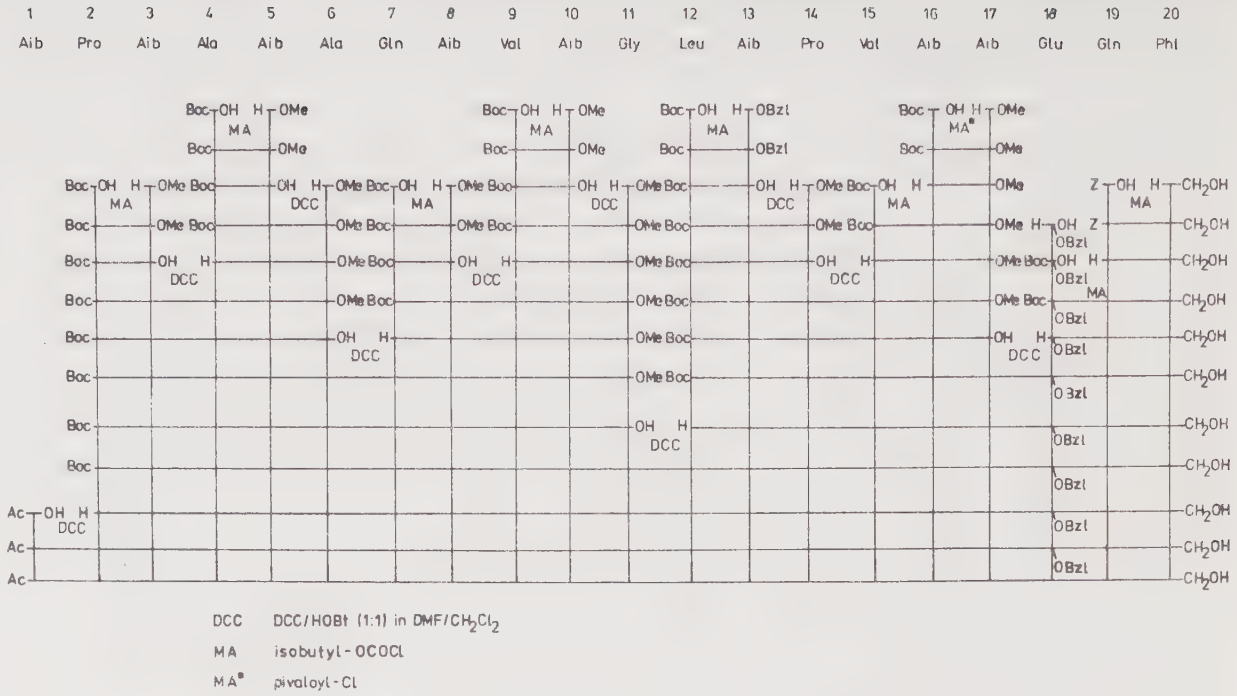


Abb. B.2: Syntheseschema des Alamethicins F-30

Verseifungen der Methylester konnten schneller in methanolischer Lösung durchgeführt werden als in 90 proz. THF.

Als Kupplungsmethoden wurden alternativ die Mischanhydridmethode und die DCC/HOBt-Kupplung verwendet. Boc-Aminosäuren wurden generell durch gemischtes Anhydrid aktiviert: Die Reaktionslösungen sind sauberer und leichter aufzuarbeiten.
Bei allen Segmentkondensationen erwies sich die Kupplung mit DCC unter Zusatz von einem Äquivalent HOBt als überlegen. Hierbei kuppelt auch Aib bei einer Aktivierungstemperatur von 35°-40°C in ausreichendem Maß, wenn die Aminokomponente nicht zu sehr sterisch gehindert ist.

2. Darstellung der Segmente A-D

2.1. Synthese von Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl (Boc-18-20, Segment A)

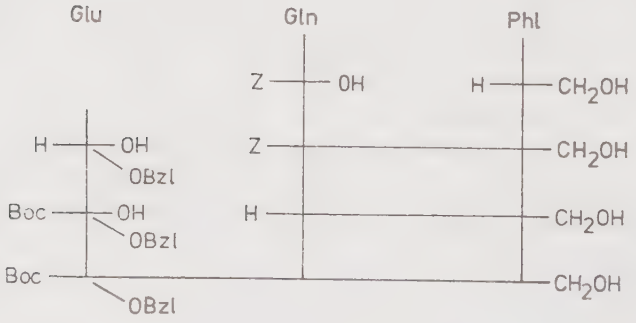


Abb. B.3: Syntheseschema des Segments A

Die Reduktion von L-Phenylalanin zu L-Phenylalaninol gelang nur in kleinen Ansätzen (ca. 1 g) in der einstufigen Reaktion mit $NaBH_4/BF_3$-etherat [64]. Im 30 g-Maßstab erwies sich die Reduktion von H-Phe-OMe oder H-Phe-OEt [65] als überlegen. Die Kupplung von Z-Gln an Phenylalaninol gelang sowohl mit der Mischanhydrid- als auch mit der DCC/HOBt-Methode, wobei die erstere jedoch erheblich weniger Nebenprodukte lieferte. Die Hydrierung an Pd/Aktivkohle (10 %) wurde ohne einen Zusatz von Eisessig durchgeführt, da Eisessig die Ringbildung zum Pyrrolidonring begünstigen kann [66]. Eine Titration der freiwerdenden Aminofunktion mit Mineralsäure war nicht notwendig.

Die Kupplung von Boc-Glu(OBzl)-OH an freies Glutaminylphenylalaninol gelang glatt über das gemischte Anhydrid. Es resultierte ein leicht gelbliches Produkt, das durch Kristallisation aus Essigester/Diisopropylether/Methanol farbloses, dünnschichtchromatographisch reines Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl ergab. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ hat eine Größe von -36.6^o (c = 1, Methanol). Dieser Wert stimmt gut mit dem von Balasubramanian et al. [15] angegebenen überein: $[\alpha]_D^{23} = -36.2^o$ (c = 1, Methanol). Nagaraj et al. [16] geben für c = 0.2 ebenfalls in Methanol $[\alpha]_D^{25} = -52.5^o$ an. Dieser Wert liegt wie eine Reihe weiterer $[\alpha]_D$-Werte dieser Arbeitsgruppe eindeutig zu hoch.

2.2. Synthese von Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH (Boc-12-17-OH, Segment B)

Boc-Aib-Aib-OMe wurde nach Leplawy et al. [58] durch Aktivierung mit Pivalinsäurechlorid dargestellt. Die Detektion mit Ninhydrin bereitete zunächst Schwierigkeiten, da dieses Dipeptid (im Gegensatz zu Boc-Aib-OH) in den üblichen Konzentrationen nicht anfärbbar ist.

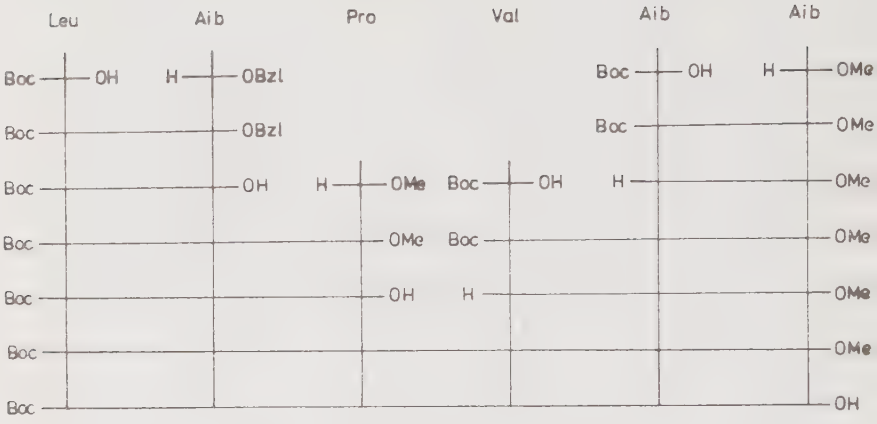


Abb. B.4: Syntheseschema des Segments B

Entacylierung durch 1.2 N HCl/Eisessig und anschließende Mischanhydridkupplung mit Boc-Val-OH ergab das sehr gut kristallisierende Boc-Val-Aib_2-OMe*. Gaschromatographisch bestimmter Anteil an D-Val: 0.27 %. Der Tripeptidester, der sonst nur noch die achirale α-Aminoisobuttersäure enthält, besitzt ein optisches Drehvermögen von $[\alpha]_D^{23} = -9.4^o$ (c = 1, Methanol). Der von Nagaraj et al. [16] berichtete Wert $[\alpha]_D^{25} = -17.5^o$ (c = 0.2, Methanol) muß als eindeutig zu hoch angesehen werden.

Parallel zur Darstellung des geschützten Tripeptidesters

---

* Kristalldaten s. Abschn. D.1.2.

Boc-Val-Aib-Aib-OMe wurde die Sequenz Leu-Aib-Pro aufgebaut. Boc-Leu-Aib-OBzl konnte wie alle Dipeptidester vom Typ Boc-X-Aib-OR über das gemischte Anhydrid in guten Ausbeuten rein erhalten werden.
Der bei der anschließenden Hydrierung verbliebene Rest an Boc-Leu-Aib-OBzl wurde durch Auswaschen entfernt, und die reine Dipeptidsäure Boc-Leu-Aib-OH mit dem stark hygroskopischen Prolinmethylesterhydrochlorid gekuppelt. Die alkalische Verseifung von Boc-Leu-Aib-Pro-OMe lieferte die freie Peptidsäure, die bei -20°C aus MeOH kristallisierte.

Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23} = -88.3^\circ$ (c = 1, Methanol) ist fast doppelt so groß wie bei der von Balasubramanian et al. [15] vermessenen Substanz: $[\alpha]_D^{23} = -48.4^\circ$ (c = 1, Methanol).

Das vollgeschützte Hexapeptid Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OMe war ohne Optimierung in 87 proz. Ausbeute mittels DCC/HOBt zugänglich. Eine kleine Menge wurde zu analytischen Zwecken an Sephadex LH-20 chromatographiert, die Hauptmenge konnte ohne weitere Reinigung verseift werden. Zusatz von 2 Äquivalenten 1 N Natronlauge ergab nach einer Reaktionszeit von 4 h bei maximal 35°C die kupplungsfähige Hexapeptidsäure in dünnschichtchromatographisch reiner Form.

Um aus den weiter oben ausgeführten Gründen das mit Prolin beginnende Heptapeptid der Sequenz 14-20 darstellen zu können, wurde parallel zur Synthese des kupplungsfähigen Segments B das Tripeptidesterhydrochlorid HCl x H-Val-Aib-Aib-OMe über das gemischte Anhydrid mit Boc-Pro-OH gekuppelt. 2 g des dünnschichtchromatographisch reinen Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OMe wurden anschließend wie das Hexapeptid verseift.

2.3. Synthese von Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe (Boc-7-11-OMe, Segment C)

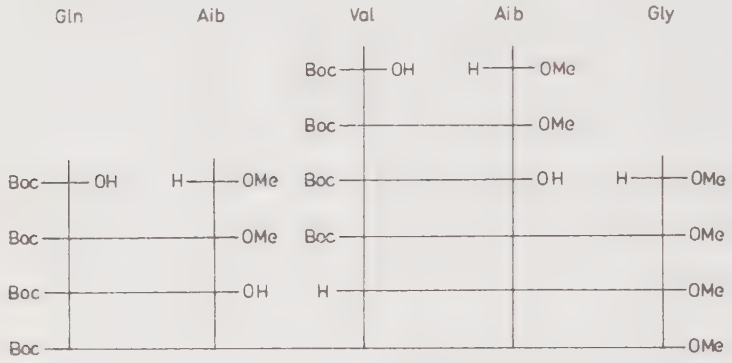


Abb. B.5: Syntheseschema des Segments C

Boc-Val-Aib-OH, leicht zugänglich durch alkalische Verseifung des Methylesters, wurde mit DCC/HOBt in DMF gekuppelt und das entstandene Boc-Val-Aib-Gly-OMe kristallisiert. Dies gelang durch Überschichten einer Essigesterlösung mit Petrolether, während erstaunlicherweise eine bis zur Trübung mit Petrolether versetzte Essigesterlösung in keinem Fall zur Kristallisation führte.

Der Dipeptidester Boc-Gln-Aib-OMe konnte ohne Nebenreaktionen an der γ-Amidfunktion glatt über das gemischte Anhydrid dargestellt werden. Auch die für die Amidgruppe gefährliche alkalische Verseifung bei erhöhter Temperatur konnte durch langsame Zugabe von 2 N NaOH einwandfrei durchgeführt werden. Die Dipeptidsäure wurde in 65 proz.

Ausbeute erhalten. Der spezifische Drehwert von Boc-Gln-Aib-OH liegt bei $[\alpha]_D^{23} = -14.6^\circ$ (c = 1, Methanol). Beim Vergleich mit Literaturwerten fällt auch hier der von Nagaraj et al. [16] zitierte Wert als zu hoch auf: $[\alpha]_D^{25} = -27.5^\circ$ (c = 0.2, Methanol) gegenüber dem von Balasubramanian et al. [15] gegebenen Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -17.0^\circ$ (c = 1, Methanol).

Boc-Gln-Aib-OH wurde mittels DCC/HOBt mit dem entacylierten Tripeptidester zum voll geschützten Pentapeptid Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe umgesetzt. Im Vergleich zu anderen geschützten Partialsequenzen des Alamethicins zeigt dieses Peptid eine überdurchschnittliche Hydrophilie (R_F in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) = 0.66). Es ist aufgrund der exponierten Glutaminyl- und Glycinreste merklich in Wasser löslich. Bei der chromatographischen Trennung von lipophileren Nebenprodukten an Kieselgel 60 wurde die Hydrophilie des Peptids durch die Verwendung eines Stufengradienten ausgenutzt.

2.4. Synthese von Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-OH (Boc-2-6-OH, Segment D)

Das Segment D Boc-Pro-$(Aib-Ala)_2$-OH besitzt eine große Ähnlichkeit zu der im Rahmen der Diplomarbeit synthetisierten Pentapeptidsäure Boc-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OH [34]. Es wurde analog zu dem bekannten Peptid aus H-Ala-Aib-Ala-OMe x HCl [55,34] und Boc-Pro-Aib-OH kondensiert. Die Dipeptidsäure Boc-Pro-Aib-OH wurde in 73 proz. Ausbeute über beide Stufen erhalten. DCC/HOBt-Kupplung beider Teilsequenzen führte in 87 proz. Ausbeute zum dünnschichtchromatographisch reinen Pentapeptidester, welcher direkt in 0.5 N NaOH in methanolischer Lösung verseift wurde. Nach der üblichen Aufreinigung konnten von Boc-Pro-$(Aib-Ala)_2$-OH Kristalle erhalten werden, die sich für eine Röntgenstrukturanalyse als brauchbar erwiesen (s. Abschn. D.1.1.).

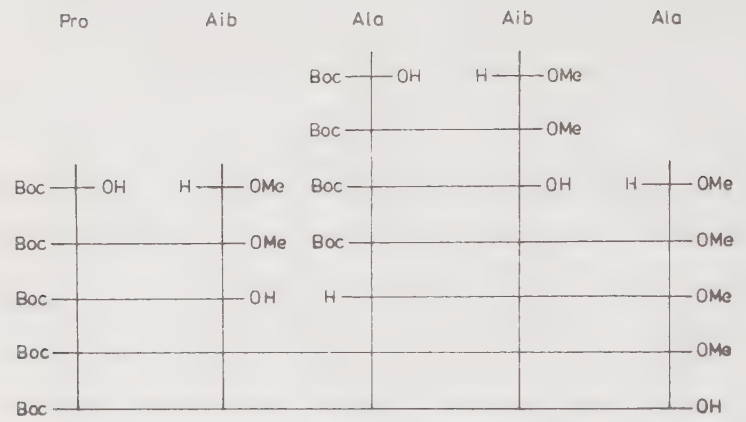


Abb. B.6: Syntheseschema des Segments D

3. Darstellung der Alamethicinvorstufe Boc-Pro^{2}-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly^{11}-Leu^{12}-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl^{20} (Boc-2-20)

3.1. Synthese von Boc-12-20 (Segmente A + B)

Vor der Kondensation der Segmente A und B wurde aus dem noch geschützten Segment A mittels Trifluoressigsäure die Boc-Gruppe abgespalten. Zur Abtrennung von unerwünschten Nebenprodukten und um Säurespuren zu entfernen, wurde Tfa x H-Glu(OBzl)-Gln-Phl mit wenig Chloroform/5 proz. $KHCO_3$ gewaschen. Es ist in beiden Phasen sehr schwer

löslich*.
Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH wurde mit äquimolaren Mengen DCC/HOBt bei 37-40°C voraktiviert und mit einem 1.04-fachen Überschuß an Aminokomponente versetzt. Nach dem üblichen Auswaschen wurde an Sephadex LH-20 in wasserfreiem Methanol chromatographiert.

Die durch Abdunsten des Methanols entstandenen Kristalle dieses C-terminalen Nonapeptids wurden röntgenstrukturanalytisch untersucht (s. Abschn. D.1.4.).
Analog zur Darstellung der Sequenz 12-20 wurde ferner mit dem geschützten Heptapeptid Boc-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl die Sequenz 14-20 aufgebaut.

3.2. Synthese von Boc-2-11-OH (Segmente C + D)

Die N-terminale Schutzgruppe von Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe wurde mit 1.2 N HCl/Eisessig ohne erkennbare Nebenreaktionen am Glutamin entfernt und das Hydrochlorid in einer DCC/HOBt-Kupplung mit Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OH kondensiert. Es handelt sich hier um die einzige Segmentkondensation im Verlauf der Totalsynthese, bei der eine racemisierungsfähige Aminosäure aktiviert werden mußte. Der gaschromatographische D/L-Test an Chirasil-Val [60] ergab nach der alkalischen Verseifung, die ein weiteres Risiko darstellt, 1.6 % D-Ala im sauren Hydrolysat. Berücksichtigt man den Blindwert für die Racemisierung bei Hydrolyse und Derivatisierung von 1.4 % D-Ala

---

* Diese Aminokomponente - wie auch die weiteren mit $KHCO_3$-Lösung behandelten - wird als Trifluoracetat beschrieben. In der Elementaranalyse wurden Fluor-Werte gefunden, die z.T. ein Drittel zu niedrig waren. Möglicherweise liegt ein Teil als freies Amin oder als Carbonat vor.

nach Frank et al. [67], kann man eine synthesebedingte Racemisierung von 0.2 % annehmen.

Die mit 0.5 N NaOH in methanolischer Lösung dargestellte Dekapeptidsäure wurde nach Chromatographie an Sephadex LH-20 in Methanol in 79 proz. Ausbeute dünnschichtchromatographisch rein erhalten.

3.3. Segmentkondensation zu Boc-2-20

Die Deblockierung von Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl mit Trifluoressigsäure ergab nach einer Reaktionsdauer von 10 min das kupplungsfähige Trifluoracetat ohne sichtbare Nebenreaktionen.

Nach der Aktivierung von Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OH mit DCC/HOBt bei $0^{\circ}C$ wurde die Aminokomponente zugegeben und 30 h bei Raumtemperatur gekuppelt. Nach üblichem Waschen und anschließender Chromatographie an Sephadex LH-20 in wasserfreiem Methanol resultierte das Nonadekapeptid in dünnschichtchromatographisch reiner Form. Es wurden insgesamt in mehreren Ansätzen 1.20 g Boc-2-20 synthetisiert. Die Ausbeute lag nach der chromatographischen Reinigung bei 67 %. Der von uns gefundene optische Drehwert $[\alpha]_D^{23} = -22.2^{\circ}$ (c = 1, Methanol) liegt fast doppelt so hoch wie der Literaturwert von Balasubramanian ($[\alpha]_D^{23} = -11.6^{\circ}$ (c = 1, Methanol)) [15].

4. Darstellung und Reinigung von Alamethicin F-30

Das durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entstandene CF_3COOH x H-2-20 wurde in 86 proz. Ausbeute erhalten.

Zur Kupplung wurde ein 1.3-facher Überschuß an Ac-Aib-OH mit DCC/HOBt aktiviert und nach Zugabe der Aminokomponente

24 h gekuppelt. Um sowohl den Überschuß an Carboxykomponente als auch mögliche Spuren der gelchromatographisch nicht abtrennbaren Aminokomponente zu entfernen, wurde basisch und sauer gewaschen. Der auf diese Weise erhaltene Alamethicin-γ-Benzylester wird als Roh-ALA(OBzl) bezeichnet.

Das günstigste Verfahren zur Darstellung von reinem Alamethicin F-30 sei an drei durchgeführten Variationen verdeutlicht (Abb. B.7).

(1) Aus 310 mg Alamethicinvorstufe Boc-2-20 waren 220 mg Roh-ALA(OBzl) nach der obigen Vorschrift erhalten worden. Bei dem Versuch, die γ-Benzylgruppe unter leicht erhöhtem H_2-Druck von 7-9 bar abzuspalten, wurden neben einer Spur Alamethicin Ausgangsprodukt und vor allem nicht weiter charakterisierte Nebenprodukte gefunden. Eine anschließende Hydrierung dieses Präparats bei Normaldruck erwies sich als erfolglos. Die Ursache der Zersetzung wurde nicht erforscht, möglicherweise ist die Acetylgruppe unter den vorliegenden Bedingungen instabil.

(2) Dieser Weg zeichnet sich dadurch aus, daß der Alamethicin-γ-Benzylester vor einer chromatographischen Feinreinigung direkt hydriert wurde. Anschließende Gelchromatographie an Sephadex LH-20 beseitigte nicht die hydrophileren Nebenprodukte (5-10 %), so daß eine Kieselgeltrennung in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) angeschlossen werden mußte, die unter relativ großen Verlusten fast reines Alamethicin lieferte.

(3) Die aus 250 mg Boc-2-20 erhaltenen 210 mg Roh-ALA(OBzl) wurden vor der Hydrierung an Kieselgel gereinigt, wobei außer DCH alle störenden Nebenprodukte entfernt werden konnten. Die anschließende Hydrierung ergab 125 mg Alamethicin ("Roh-ALA"), welches DCH und Spuren des

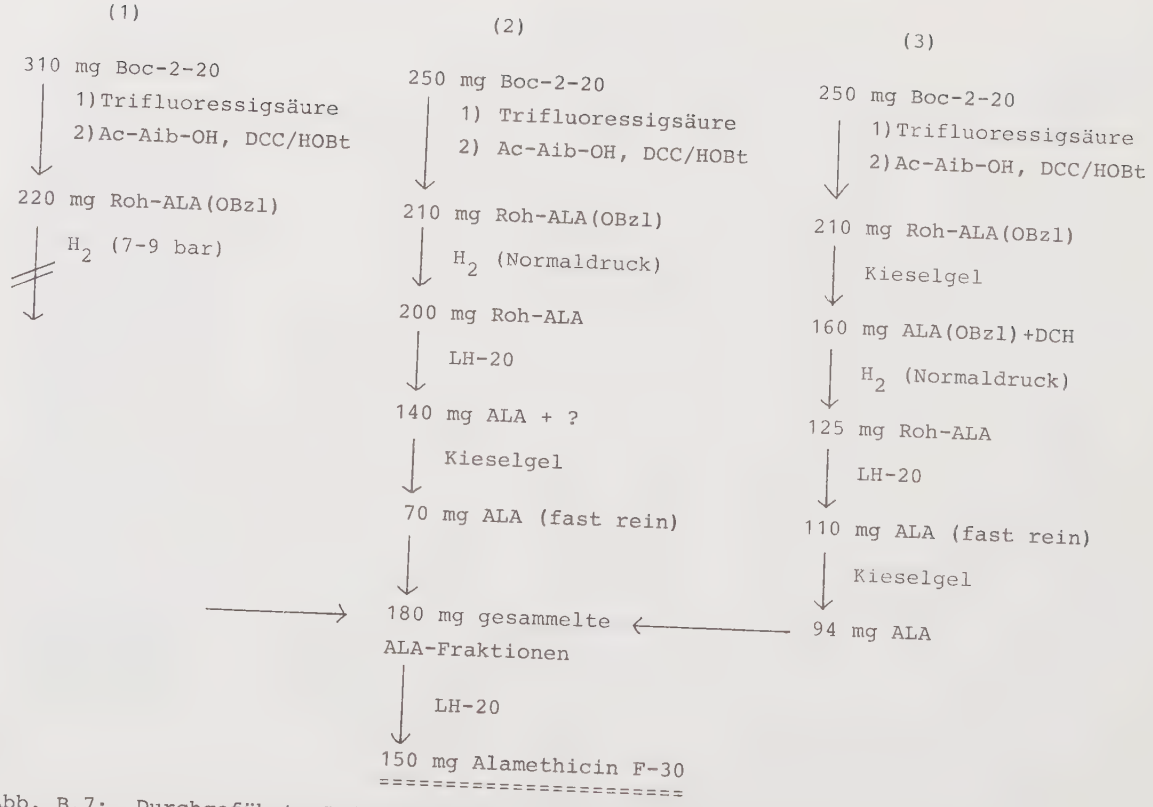


Abb. B.7: Durchgeführte Reinigungsschritte zu Alamethicin F-30 nach der letzten Kupplung

γ-Benzylesters enthielt. Zwei anschließende chromatographische Reinigungsschritte ergaben 94 mg Alamethicin. Dieser Weg (3) erwies sich somit der Aufarbeitung (2) als überlegen.

Die gesammelten Alamethicin-Chargen wurden zur Abtrennung evtl. vorhandener Kieselgelspuren und zur Beseitigung letzter Verunreinigungen an Sephadex LH-20 chromatographiert. Es wurden 150 mg dünnschichtchromatographisch reines Alamethicin F-30 gewonnen.

Abbildung B.8 zeigt ein HPLC-Chromatogramm des so gereinigten Alamethicins (a) im Vergleich zu natürlichem Alamethicin F-30 (Upjohn) (b), sowie die HPLC-Trennung eines Gemisches (1:1) aus synthetischem und natürlichem Produkt (c).

Wenn auch die Trennungsbedingungen weiter variiert werden müßten, um eine sichere Aussage über die Reinheit des synthetischen Materials machen zu können, so zeigt das Chromatogramm doch - wie alle anderen experimentellen Beweise - die Identität des Syntheseprodukts mit der Hauptkomponente des aus Trichoderma viride isolierten Alamethicins F-30.

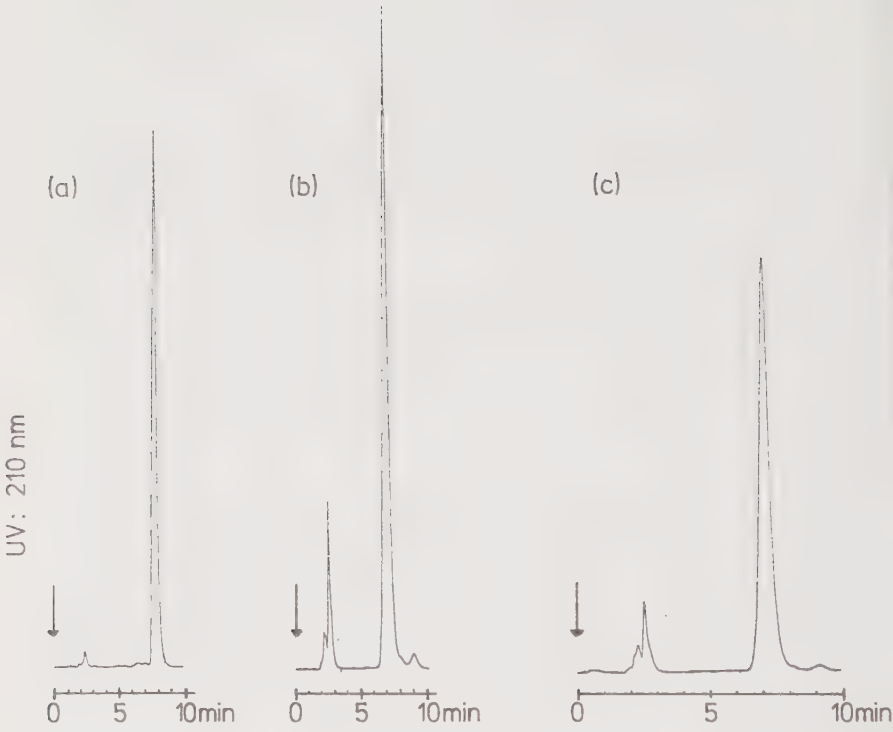


Abb. B.8: HPLC-Trennung von (a) ALA F-30 (synth.), (b) ALA F-30 (Upjohn) und (c) einem 1:1 Gemisch beider Produkte.
(Lichrosorb NH2 5 µ, 4 x 250 mm, Acetonitril/H_2O (50:7) Detektion bei 210 nm)

5. Vergleich mit bisherigen Alamethicin-Synthesen

Im Verlauf der hier dargestellten Synthese wurden 1981 von drei Arbeitsgruppen drei verschiedene Alamethicinsynthesen publiziert.

1) Vier Jahre nach einem schon 1977 gegebenen vorläufigen Symposiumsbericht [12] beschrieben Gisin et al. [14] ihre Kombination aus Merrifieldsynthese und Segmentkondensation. Sie synthetisierten die vier Partialsequenzen 1-4, 5-8, 9-17 und 18-20 am polymeren Träger und erhielten nach anschließender Segmentkondensation und HPLC-Reinigung 6 mg Alamethicin.

Die Abspaltung vom Träger erfolgte durch Behandlung mit wasserfreiem Fluorwasserstoff. Der säurelabile N-Terminus Ac-Aib-Pro-R wurde dieser Prozedur im Lauf der sukzessiven Abspaltungen und Kupplungen viermal unterworfen.

Die Ausbeuten der Kupplungen am Träger wurden auf mehr als 98 % bestimmt, wenn Aib eine der Komponenten war. Für die Kupplung zu Boc-Aib^{16}-Aib^{17}-ORes wurde kein Umsatz angegeben, doch ein Vorliegen von Fehlsequenzen könnte sich in dem äußerst niedrigen Aib-Wert der Aminosäureanalyse des (9-17)-Nonapeptids Boc-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-ORes ausdrücken:
Val 1.86(2), Pro 1.15(1), Leu 1.12(1), Gly 1.10(1), Aib 3.76(4)

Bezogen auf den Glycin-Wert als 1.0 würde sich somit für Aib 3.42 statt 4.0 ergeben. Ein ungenauer Bestimmungswert für Aib resultiert im übrigen hier nicht aus den bekanntlich schlechten Anfärbefaktoren mit Ninhydrin: Gisin et al. arbeiteten mit Tritium-markiertem Aib (Methyl-^{3}H-Aib), welches durch empfindliche Radioisotopenanalyse bestimmt wurde.

Bezüglich der möglichen Racemisierung während der Synthese, insbesondere der Segmentkondensationen, wurde nur ein Anteil von 2 % D-Ala nach Manning-Moore [68] im N-terminalen Acetyl-Oktapeptid angegeben.

Das 600 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum [69] zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen natürlichem und synthetischem Alamethicin; das Massenspektrum (^{252}Cf fission fragment MS) zeigt identische Massen von 1963.

Im antibiotischen Test zeigte sich das synthetische Produkt mit dem HPLC-gereinigten natürlichen Alamethicin in seiner Aktivität gegen Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus innerhalb der Meßungenauigkeit als identisch.

Des weiteren wurde die Membranaktivität bestimmt, indem bei variierter Alamethicin-Konzentration [µg/ml] die Spannung [mV] angegeben wurde, die eine Leitfähigkeit von 30 µS/cm^2 erzeugt. Die Ergebnisse sind vergleichbar sowohl mit dem mikroheterogenen wie mit dem HPLC-gereinigten Naturprodukt. Dieser Test kann jedoch nicht als Reinheitskriterium gelten, da sich bei der Messung der "makroskopischen" Leitfähigkeit auch zwischen den beiden Proben des natürlichen Alamethicins (mit und ohne Nebenkomponenten) kein Unterschied feststellen läßt.

Demgegenüber stellt eine Einzelporencharakteristik (s. Abschnitt E) ein sehr anspruchsvolles Reinheitskriterium dar. Messungen dieser Art wurden von Gisin et al. nicht durchgeführt.

2) Balasubramanian et al. [15] beschrieben eine klassische Synthese des Alamethicins sowie eine HPLC-Trennung des von Upjohn bezogenen natürlichen Antibiotikums. Schon in einem vorläufigen Tagungsbericht im Jahre 1979 [70] war die Synthese von der gleichen Arbeitsgruppe erwähnt worden mit dem

Hinweis, daß das Produkt gegen Staphylococcus aureus keine antibiotische Aktivität zeige.

Zu der Präsentation dieser Synthese sei erwähnt, daß sich im Experimentellen Teil die Beschreibung aller 19 notwendigen Kupplungsschritte zum Alamethicin samt Reinigungsoperationen in einer einzigen allgemeinen Arbeitsvorschrift erschöpft. Als einzige auf eine definierte Substanz bezogene Vorschrift nimmt die Versuchsbeschreibung zur Darstellung des Praktikumspräparats Tos x H-Aib-OBzl fast den gleichen Raum ein. Analysendaten der Zwischenprodukte wurden tabellarisch dargestellt. Kupplungen wurden jeweils mit 100 % Überschuß an DCC/HOBt, bezogen auf Carboxy- wie auf Aminokomponente, durchgeführt.

Von zwei Tri- und einem Tetrapeptid wurden die Kristallstrukturen bestimmt.

Über die Menge an reinem synthetisiertem Alamethicin findet sich keine explizite Aussage. Aus den tabellarisch aufgeführten Daten muß man auf eine Ausbeute von 97 mg (Roh?-) Produkt schließen.

Die angeführten Reinheits- und Aktivitätstests wurden mit HPLC-gereinigtem Produkt durchgeführt, so daß sich über die Reinheit der Hauptmenge keine Aussage machen läßt.

Gegen Staphylococcus aureus zeigte das HPLC-gereinigte Peptid im Gegensatz zur isolierten Hauptfraktion des natürlichen Alamethicins keine antibiotische Aktivität. In Hämolyse-Experimenten verhielten sich natürliches und synthetisches Alamethicin innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen gleich. Dasselbe gilt von den Messungen der Membranaktivität, die unter genau gleichen Bedingungen wie bei Gisin et al. untersucht wurde (beide Experimente wurde von J.E. Hall durchgeführt). Obwohl von Einzelporenmessungen am HPLC-gereinigten natürlichen Alamethicin berichtet wird

Tab. B.1: Tabellarische Gegenüberstellung der bisherigen Alamethicin-Synthesen

	Gisin et al.	Balasubramanian/ Marshall	Nagaraj/Balaram	Schmitt
Reinigung des Endprodukts	C_{18}-Kieselgel Sephadex G-10 HPLC	analytisch: HPLC	Kristallisation	präparativ: Kieselgel 60, Sephadex LH-20
dargestellte Substanzmenge	6 mg	97 mg (?) Roh(?)-Produkt	?	150 mg
Schmp.	-	249 - 255°C	237°C	259-264°C (Zers.)
$[\alpha]_D$	$[\alpha]_D^{23} = -5.5^\circ$ (c=1, Ethanol) (Rohprodukt)	-	-	$[\alpha]_D^{23} = -13.4^\circ$ (c=1,Methanol)
Aminosäureanalyse (Aib; Pro; Ala; Glx; Val; Gly; Leu)	8.33(8);1.99(2); 1.90(2);2.99(3); 2.01(2);1.06(1); 1.00(1)	8.35(8);2.00(2); 1.88(2);2.88(3); 2.26(2);1.11(1); 1.09(1)	-(8);1.60(2); 1.82(2);2.86(3); 1.83(2);1.00(1); 0.92(1)	8.00(8);2.06(2); 2.09(2);2.96(3); 2.05(2);0.97(1); 1.05(1)

Fortsetzung der Tab. B.1

D-Aminosäuren-bestimmung	-	-	-	D-Pro 2.0%, D-Ala 0.9%, D-Glx 2.8%, D-Val 0.9%, D-Leu 3.4%, D-Phl 0.6%
Spektroskopische Charakterisierung	^{1}H-NMR	^{1}H-NMR [69]	UV, CD	^{13}C-NMR, CD
Einzelporen-charakteristik	-	-	-	äußerst scharfe Leitwerte
makroskop. Leitfähigkeits-vergl. mit ALA	ja	ja	-	-
Antibiotische Aktivität	pos.geg.S.aureus pos.geg.B.subtilis	neg.geg.S.aureus pos.geg.B.subtilis	-	pos.geg.S.aureus pos.geg.B.subtilis
Sonstiges	MS	83±7% der Hämolyse-aktivität des nat. Alamethicins	a) Zeitabhängigkeit der Ca^{2+}-Chlor-tetracyclin-Fluores-zenz in Ei-Lecithin-Vesikeln nach ALA-Zugabe b) Zellparameter des Alamethicins	a) HPLC b) Guanylat-Cyclase-Aktivität

- nicht abgebildet -, wurden keinerlei Vergleichsmessungen mit synthetischem Material zitiert.

3) Nagaraj und Balaram [16] synthetisierten ebenfalls das 20-Peptid Alamethicin. Ihre klassische Synthese lieferte ein Produkt, das dünnschichtchromatographisch noch einen leichten Schatten aufweist.
Trotz der im Vergleich zu Balasubramanian et al. relativ detailliert beschriebenen Synthese ist leider gerade die Kupplung zum Endprodukt in Ansatzgröße und Ausbeute völlig entstellt. Wenn die angegebene prozentuale Ausbeute von 35 % auf den Einsatz an DCC/HOBt bezogen wird, ergeben sich ca. 70 mg des Endprodukts, die ohne chromatographische Reinigung kristallisiert wurden.

Die Zellparameter der kristallisierten Segmente 1-6, 1-13 und des synthetischen Alamethicins wurden angegeben.

Zur Charakterisierung des Endprodukts wurden keine ^{1}H- oder ^{13}C-NMR-Spektren, keine D-Aminosäurenbestimmung und weder antibiotische Wirkungstests noch Membranaktivitätsmessungen durchgeführt.

Ein Vergleich der drei kurz referierten Alamethicin-Synthesen mit der vorliegenden Synthese zeigt Tab. B.1.

C. ^{13}C-NMR-SPEKTROSKOPIE

Die ^{13}C-NMR-spektroskopische Untersuchung aller N-geschützten Peptidsäuren bzw. -ester war eine wertvolle Kontrolle im Verlauf der Alamethicinsynthese. Auf diese Weise konnte nach jedem Kupplungsschritt das Wachsen der Peptidkette in eindeutiger Weise verfolgt werden.

Außer dem kaum zu unterschätzenden Wert der ^{13}C-NMR-Spektroskopie für die synthetische Arbeit bietet diese Methode bei der Untersuchung von Aib-Peptiden noch einen besonderen Vorzug: Die beiden α-Methylgruppen der α-Aminoisobuttersäure liegen in der freien Aminosäure und in ihren konformativ frei beweglichen Derivaten magnetisch äquivalent vor, sie unterscheiden sich jedoch bei asymmetrischer Umgebung. Bei der Konformationsaufklärung der Polypeptidantibiotika Alamethicin [9], Suzukacillin [64] und Trichotoxin [71] sowie verschiedener Modellpeptide [27,72,73] wurde gefunden, daß eine große magnetische Nichtäquivalenz (MNE) der geminalen α-Methylgruppen der Aib-Peptide zumindest eine relativ starre Konformation anzeigt. Die größte MNE von bis zu 4 ppm wurde in α-helikalen Bereichen gefunden, während in einer fixierten nicht-helikalen Konformation bisher maximal eine MNE von 2.6 ppm beobachtet wurde, wie sie in Ac-Ala-Aib-Ala-OMe vorliegt. Die Röntgenstrukturanalytik dieses Tripeptids ergab eine β-Turn-ähnliche Struktur [74]. Im Gegensatz dazu zeigen freier bewegliche Aib- Di- und Tripeptide keine oder nur eine geringe MNE von kleiner als 1 ppm.

Bei einigen Peptiden mit bekannter Kristallstruktur wurde von Jung et al. [74] die Hoch- bzw. Tieffeldverschiebung der Aib-C_β-Signale den Aib-pro-(S)- bzw. pro-(R)-C_β-Atomen zugeordnet. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der relativen Lage des einzelnen C_β-Atoms zur benachbarten Aib-Carbonylgruppe.

Im folgenden wird versucht, die Fülle an ^{13}C-NMR-spektroskopischem Material zu sichten. Ziel der Diskussion der Spektren ist es, auf bemerkenswerte Veränderungen in den Signallagen aufmerksam zu machen, wie sie in veränderter chemischer Umgebung während des Wachsens der Peptidkette auftreten. Dabei muß hier außer in der Interpretation der Aib-C_β-Signale eine mehr beschreibende als interpretierende Betrachtung genügen.

Eine der günstigsten Voraussetzungen für die Diskussion der chemischen Verschiebungen der hier vorgelegten Spektren besteht in der Tatsache, daß alle ^{13}C-NMR-Spektren in Deuteromethanol aufgenommen werden konnte. Damit entfällt jede Lösungsmittelabhängigkeit der diskutierten Verschiebungen.

1. ^{13}C-NMR-Spektren der Di- und Tripeptide

Die chemischen Verschiebungen der im folgenden diskutierten Di- und Tripeptide sowie von L-Phenylalaninol sind tabellarisch zusammengefaßt in den Tabellen C.1 bis C.3.

L-Phenylalaninol (Tab. C.1) zeigt im Bereich von 140.0 bis 127.2 ppm die Resonanzen der aromatischen C-Atome. Ein Charakteristikum für den Phenylring dieses Aminoalkohols ist die separate Lage von C-4 bei 127.2 ppm. Die chemische Verschiebung dieses aromatischen C-4-Atoms ist nicht nur vom freien Phenylalaninol (δ_{C-4} = 127.2 ppm) bis hin zum Alamethicin (δ_{C-4} = 127.1 ppm) äußerst konstant, sondern dieses Signal erscheint auch erstaunlicherweise immer um etwa 2 ppm hochfeldverschoben gegenüber der benachbarten Resonanz der C-2,4-Atome. Im Gegensatz zu den Spektren der Z-Gruppe, bei denen die Signale von C-2,4,6 meist zusammenfallen, zeigen alle Phl-Spektren das charakteristische Aussehen dieses "abgespreizten kleinen Fingers". Die übrigen

Tab. C.1: ^{13}C-NMR-Daten der Di- und Tripeptide (I)

	CO	Aib		Glx			Phl				Schutz-
		C_α	C_β	C_α	C_β	C_γ	C_α	C_β	CH_2OH	C_{arom}	gruppen
Phenyl-alaninol (Phl)							55.3	40.7	66.6	140.0(C-1) 130.2(C-3,5) 129.4(C-2,6) 127.2(C-4)	
Z-Gln-Phl	177.8 173.9			54.1	29.2	32.4	56.2	37.9	63.9	139.5(C-1) 130.4(C-3,5) 129.4(C-2,6) 127.3(C-4)	164.6(Z-CO) 138.2(C-1) 129.4(C-3,5) 128.9(C-2,4,6) 67.8(Z-CH_2)
Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl	177.9 174.4 174.2 173.0			a) 54.2 b) 54.2	28.1 29.0	31.3 32.4	55.5	37.9	63.9	139.5(C-1) 130.3(C-3,5) 129.3(C-2,6) 127.3(C-4)	157.9(Boc-CO) 80.8(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3) 137.4(Bzl-C-1) 129.5(Bzl-C-3,5) 129.1("-C-2,4,6) 67.4(CH_2)
Boc-Gln-Aib-OH	177.9 177.5 173.5	57.0	25.4 25.0	55.7	29.3	32.4					157.4(Boc-CO) 80.7(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3)

a) Glu

b) Gln

nicht-aromatischen Signale bei 66.6 (CH_2OH), 55.3 ("C_α") und 40.7 ppm (Bzl-CH_2) differieren um bis zu 3 ppm gegenüber peptidgebundenem Phenylalaninol.

Im Dipeptid Z-Gln-Phl wurde eine befriedigende Unterscheidung zwischen den aromatischen Phl-Signalen und denen der Z-Schutzgruppe dadurch erreicht, daß die übliche Aufspaltung der beiden Z-C-3,5- und Z-C-2,4,6-Resonanzen von $\Delta\delta \sim 0.4$-0.5 ppm berücksichtigt wurde. Das Signal der alkoholischen Phl-CH_2OH-Gruppe erscheint mit 63.9 ppm wie das der Bzl-CH_2-Gruppe bei 37.9 ppm um knapp 3 ppm hochfeldverschoben, verglichen mit freiem Phenylalaninol.

Das geschützte Tripeptid Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl zeigt gegenüber dem vorigen Dipeptidspektrum vor allem die neu dazu gekommenen Glutaminsäure-Signale. Während die beiden Glu- und Gln-C_α-Signale die gleiche Verschiebung von 54.2 ppm aufweisen, unterscheiden sich sowohl die C_β- als auch die C_γ-Signale der beiden Aminosäuren um circa 1 ppm. Die Zuordnung ist aufgrund des Vergleichs mit Z-Gln-Phl evident.

Boc-Gln-Aib-OH besitzt mit 177.9, 177.5 und 173.5 ppm eine bemerkenswerte Verteilung der CO-Signale, die eine Zuordnung der γ-Gln-Carbonylgruppe zu 173.5 ppm nahelegt. Ein Blick auf die CO-Signallagen von Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl (177.9, 174.4, 174.2, 173.0) zeigt jedoch auch die Problematik von Zuordnungen im sehr variablen Carbonylbereich. Bei diesem Tripeptid muß mindestens eine Glx-α-Carbonylgruppe bei relativ hohem Feld (174.4 ppm) erscheinen. Boc-Gln-Aib-OH zeigt eine Gln-C_α-Resonanz von 55.7 ppm, die damit um 1.5 ppm bei tieferem Feld liegt als in Verbindungen mit Gln-Phl-Verknüpfungen.

Die beiden Dipeptide Boc-Leu-Aib-OBzl (Tab. C.2) und Boc-Leu-Aib-OH zeigen naturgemäß sehr ähnliche Spektren. In beiden ist keine Unterscheidung zwischen Leu-C_γ- und den

Tab. C.2: ^{13}C-NMR-Daten der Di- und Tripeptide (II)

	CO-Signale	Aib C_α	Aib C_β	Pro C_α	Pro C_β	Pro C_γ	Pro C_δ	Leu C_α	Leu C_β	Leu C_γ	Leu C_δ	Schutzgruppen
Boc-Leu-Aib-OBzl	175.4 174.8	56.9	25.7-25.1 (2 Peaks)					54.0	42.3	25.7-25.1 (1 Peak)	23.4 22.0	157.8(Boc-CO) 80.4(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3); 137.3(Bzl-C-1) 129.5(" -C-3,5) 129.2(C-2,4,6) 68.0(Bzl-CH_2)
Boc-Leu-Aib-OH	177.5 174.6	57.0	25.8-25.1 (2 Peaks)					54.5	42.1	25.8-25.1 (1 Peak)	23.4 22.1	157.6(Boc-CO) 80.6(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3)
Boc-Leu-Aib-Pro-OH	176.0 174.6 173.8	57.4	26.7-24.5 (2 Peaks)	62.0	28.9	"24.5"	49.9	53.9	42.1	26.7-24.5 (1 Peak)	23.4 21.9	157.7(Boc-CO) 80.5(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3)
Boc-Pro-Aib-OMe	176.2 174.7	57.0	25.6 25.2	61.1	31.9	24.7	48.1					156.0(Boc-CO) 81.2(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3); 52.8(OMe)
Boc-Pro-Aib-OH	177.4 174.4	56.9	25.6 25.0	61.2	32.0	24.6	47.9					156.0(Boc-CO) 81.2(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3)

Aib-C_β-Signalen möglich. Von den drei Peaks in Boc-Leu-Aib-OH bei 25.8, 25.2 und 25.1 gehören zwei zu Aib-C_β-Signalen.

Ähnlich schwierig ist eine Zuordnung bei dem Spektrum der Tripeptidsäure Boc-Leu-Aib-Pro-OH zu treffen. Neben den beiden Leu-C_δ-Signalen bei 23.4 und 21.9 ppm werden 4 Signale bei 26.7, 25.9, 25.6 und 24.5 ppm beobachtet. Sie gehören zu 2 Aib-C_β-, 1 Leu-C_γ und 1 Pro-C_γ-Atom. Eine mögliche Aufspaltung der beiden Aib-C_β-Methylgruppen um $\Delta\delta$= 2.2 ppm ist hier nicht zu erwarten - wenn auch nicht auszuschließen -, da Boc-Leu-Aib-Pro-OH mit seinem Prolin-Imino-Stickstoff keine H-Brücke und damit keinen β-Turn bilden kann (s. Abschnitt D.1.). Gegen eine MNE der Aib-C_β-Signale spricht auch eine Betrachtung der Pro-C_γ-Resonanz in Boc-Pro-Aib-OMe/OH: Dort wurde zwischen Aib-C_β und Pro-C_γ aufgrund der Peakform unterschieden: Während die beiden Aib-C_β-Signale in Boc-Pro-Aib-OMe (25.6, 25.2 ppm) eine sehr scharfe Form besitzen, zeigt sich Pro-C_γ bei 24.6 ppm als Signal geringerer Intensität und größerer Breite.

Daher sollte auch im Boc-Leu-Aib-Pro-OH das Signal bei 24.5 ppm zur Pro-C_γ-CH_2-Gruppe gehören. Ein bisher nicht durchgeführtes Spin-Echo-Experiment könnte hier Klarheit schaffen. Eine Zuordnung zu Leu-C_γ-(CH) und den beiden noch nicht determinierten Aib-C_β-(CH_3)-Signalen würde Experimente mit $^1H/^{13}C$-Selektiventkopplungen erfordern.

Unter den in Tabelle C.3 aufgeführten Aib-Peptiden ist vor allem die magnetische Nichtäquivalenz (MNE) der beiden Aib-C_β-Methylgruppen im Tripeptidester Boc-Val-Aib-Gly-OMe erwähnenswert (Abb. C.1). Während in Boc-Val-Aib-Aib-OMe nur eine MNE von 0.6 ppm beobachtet wird, zeigt das glycinhaltige Derivat mit Signalen bei 26.4 und 24.5 ppm eine Aufspaltung von immerhin 1.9 ppm, die für ein Tripeptid beachtlich ist. Dies läßt sich mit dem Vorliegen eines β-Turns erklären, worauf auch das in Abschnitt D.2.2. diskutierte CD-Spektrum hinweist.

Tab. C.3: ^{13}C-NMR-Daten der Di- und Tripeptide (III)

	CO-Signale	Aib C_α	Aib C_β	Val C_α	Val C_β	Val C_γ	Gly C_α	Schutzgruppen
Boc-Aib-Aib-OMe	176.8 176.3	57.1 57.0	25.6 (2x) 25.1 (2x)					156.2(Boc-CO) 80.4(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3); 52.7 (OMe)
Boc-Val-Aib-Aib-OMe	176.4 176.0 173.9	57.8 57.2	25.6 25.2 25.0 (2x)	62.3	31.4	19.6 18.9		158.2(Boc-CO) 80.6(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3); 52.6 (OMe)
Boc-Val-Aib-OH	177.5 173.5	56.9	25.3 25.1	61.1	32.3	19.7 18.5		157.7(Boc-CO) 80.5(Boc-Cq) 28.7(Boc-CH_3)
Boc-Val-Aib-Gly-OMe	177.1 174.0 171.5	57.8	26.4 24.5	62.1	31.3	19.7 19.1	42.1	158.2(Boc-CO) 80.5(Boc-Cq) 28.8(Boc-CH_3); 52.5(OMe)
Ac-Aib-OH	178.0	56.8	25.4 (2x)					172.6(Ac-CO) 22.6(Ac-CH_3)

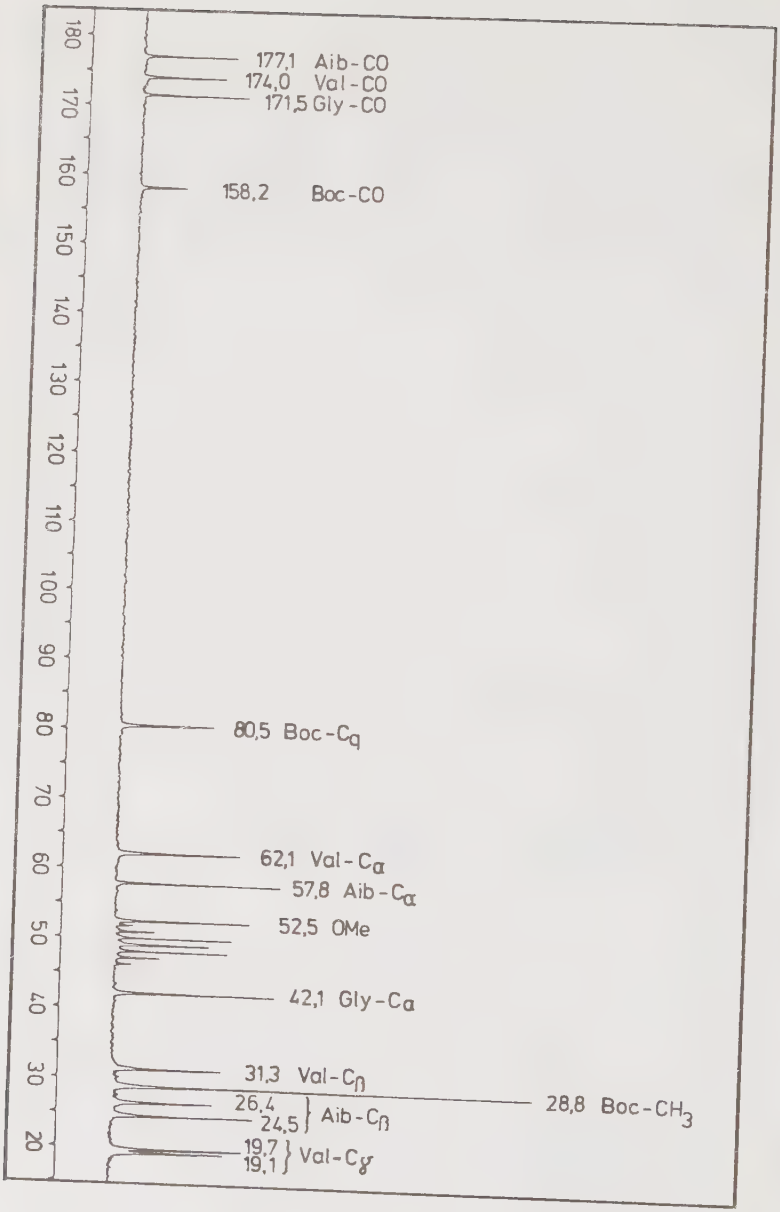


Abb. C.1: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-Val-Aib-Gly-OMe, ^{2}H-Methanol

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Aib-C_β-MNE von $\Delta\delta$ = 1.5 ppm (in $CDCl_3$) von Z-Val-Aib-Gly-OBu^t [75], ein typisches Beispiel für den geringen Einfluß von Schutzgruppen auf Peptidkonformationen.

2. Spektren der Tetra- bis Hexapeptide

Tabelle C.4 zeigt die chemischen Verschiebungen aller synthetischen Tetra- bis Dekapeptide. Zunächst werden im folgenden - beim C-Terminus beginnend - die Spektren der Tetra- bis Heptapeptidsegmente diskutiert.

Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OH und das um 2 Aminosäurereste N-terminal verlängerte Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH zeigen ähnliche Spektren. Sehr markant ist aber u.a. die Veränderung der Prolinsignale. Das Pro-C_α-Signal der Tetrapeptidsäure fällt bei 61.1 ppm mit Val-C_α zusammen und zeigt damit eine vergleichbare Verschiebung wie andere Boc-Pro-Peptide: 61.2 ppm in Boc-Pro-Aib-OH, 61.0 ppm in Boc-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl. Demgegenüber treten für Val- und Pro-C_α in der Hexapeptidsäure Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH zwei Signale bei 64.4 ppm und 62.3 ppm auf. Da sich beim Übergang zum Hexapeptid praktisch nur die chemische Umgebung für Prolin ändert und auch andere Pro-Signale relativ starke Verschiebungen erfahren, wird das Signal bei 64.4 ppm dem Pro-C_α-Atom zugeordnet. Es liegt damit im lipophilen Peptidverband um 3.3 ppm bei tieferem Feld als im Boc-Prolylpeptid. Stark hochfeldverschoben von 32.3 auf 29.9 ppm erscheint demgegenüber das C_β-Signal des Prolins in Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH, verglichen mit der analogen Tetrapeptidsequenz. Das Pro-C_γ-Signal liegt ohne Spin-Echoexperiment ununterscheidbar zwischen den Aib-C_β-Methylresonanzen. Es sei bereits hier darauf hingewiesen, daß dieses Signal sehr empfindlich auf die

Tab. C.4: ^{13}C-NMR-Daten der Tetra- bis Dekapeptide

	CO-Signale	Aib C_α	Aib C_β	Pro C_α	Pro C_β
Boc-Pro-Val-Aib$_2$-OH (Boc-14-17-OH)	177.9,175.8 175.5,173.2	57.9 57.1	26.2,25.4 24.8(3x) (mit Pro-C_γ)	61.1	32.3
Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH (Boc-12-17-OH)	178.0,175.9 175.8,175.4 174.5,173.7	57.7 (2x) 57.0	26.8,26.6 26.5,25.8 25.7,24.8 24.5,23.9 (einschl. Pro/Leu-C_γ)	64.4	29.9
Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe (Boc-7-11-OMe)	177.4(3x), 174.4,173.1 171.9	57.9 57.8	26.8 25.6(2x) 24.4		
Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe (Boc-2-6-OMe)	176.9,176.7 175.0,174.3 173.9	57.9 57.6	26.7 25.5(2x) 24.7	62.1 61.3 (Z/E)	31.1
Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-OH (Boc-2-6-OH)	177.2,176.8 175.9,175.3 174.4	58.0 57.8	26.9 25.6(2x) 24.7	62.3	31.2
Boc-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl (Boc-14-20)	178.3, 176.7(2x) 175.5,174.3 173.7,173.6 173.1	57.6 (2x)	27.3 26.7 24.3 23.8	61.0	30.9
Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl (Boc-12-20)	178.6,177.4 177.0,176.4 176.0 175.2(2x) 174.6,174.1 173.9	57.9 57.7 57.5	27.6(2x) 27.0 23.7-23.2 (3x)	64.6	29.9
Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OH (Boc-2-11-OH)	178.2 177.7(2o.3x) 177.5,177.4 177.1,176.6 175.2,175.0 173.1 (164.7 ?)	58.1 (2x) 57.5 (2x)	27.7,27.4 27.3,26.4 24.9 23.8(2x) 23.7	63.5	32.6 (breit)

Pro		Ala		Glx			Val		
C_γ	C_δ	C_α	C_β	C_α	C_β	C_γ	C_α	C_β	C_γ
26.2-24.8 (1 Peak)	48.0						61.1	31.4	19.7 19.4
"26"	49.7						62.3	30.5	19.9 19.6
				57.1	28.0	32.5	61.4	30.9	19.7 19.2
25.2	48.3	51.7 49.6	17.4 16.6						
25.6	48.4	51.7 49.7	17.8 16.9						
25.4	48.1			55.1 54.1	28.1 26.9	32.8 31.9	61.8	30.8	19.3 (2x)
"27.0"	50.0			"55.9" 54.4	28.2 27.0	33.0 32.1	64.6	30.3	20.9 19.6
25.6	48.3 48.2 (Z/E)	53.8 53.0	17.2 (2x)	57.5	30.6	31.7	60.6	31.3	19.8 18.4

	Gly	Leu				Phl	
	C_α	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_α	C_β
Boc-14-17-OH							
Boc-12-17-OH		54.9	41.9	25.8-24.5 (1 Peak)	23.2 22.0		
Boc-7-11-OMe	42.1						
Boc-2-6-OMe							
Boc-2-6-OH							
Boc-14-20						56.0	37.9
Boc-12-20		"55.4"	42.0	"26.0"	"23.5" 22.3	56.8	38.2
Boc-2-11-OH	36.9						

Phl CH_2OH	C_{arom}	Schutzgruppen
		156.3; 81.3; 28.7 (Boc)
		157.5; 80.7; 28.7 (Boc)
		158.2; 81.1; 28.7 (Boc) 52.6 (OMe)
		156.5; 81.3; 28.8 (Boc) 52.5 (OMe)
		156.9; 81.6; 29.0 (Boc)
64.4	139.3; 130.2; 129.0; 127.0	156.6/155.6 (Z/E), 81.6/81.2 (Z/E), 28.8 (Boc); 136.9; 129.3; 129.0; 67.2 (Bzl)
64.7	139.9; 130.5; 129.0; 127.2	157.6; 80.8; 28.9 (Boc); 137.6; 129.5; 129.0; 67.1 (Bzl)
		157.2/157.0 (Z/E); 81.9/81.0 (Z/E), 28.8 (Boc)

Position des Prolins reagiert, wie am Beispiel des 19-Peptids Boc-2-20 und des Alamethicins gezeigt werden wird. Einer der Peaks um 26 ppm sollte daher das Pro-C_γ-Signal sein, da Pro^{14}-C_γ in Boc-2-20 bei 27.0 ppm zu finden ist.

Die zweite auffallende Veränderung zwischen Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OH und der Leucyl-hexapeptidsäure betrift die MNE der Aib-C_β-Methylgruppen. Während das Tetrapeptid eine maximale Aufspaltung von $\Delta\delta \leq 1.4$ ppm aufweist, beträgt die MNE im Hexapeptid mindestens 2.7 ppm (von 26.6 bis 23.9 ppm).

Der Pentapeptidester Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe zeigt im wesentlichen die gleichen Signallagen wie die Segmente Boc-Gln-Aib-OH und Boc-Val-Aib-Gly-OMe.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum des 3_{10}-helikalen Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OH (s. Abschn. D.1.) ist in Abb. C.2 gezeigt. Neben den erwarteten 5 Carbonylsignalen zwischen 177.2 und 174.4 ppm und den bekannten Signalen von Boc-CO und Boc-Cq sind alle übrigen Signale in der Abbildung gespreizt wiedergegeben.

Pro-C_α bei 62.3 ppm erscheint wie alle anderen aufgelösten Prolinsignale relativ klein und breit. Die beiden Aib-C_α treten bei 58.0 und 57.8 ppm mit einer sehr geringen unterschiedlichen Verschiebung auf, während die beiden Ala-C_α bei 51.7 und 49.7 ppm immerhin 2.0 ppm auseinanderliegen. Im Tripeptid Boc-Ala-Aib-Ala-OMe [72] tritt die fast identischen Differenz von 2.1 ppm für Ala-C_α auf (51.9, 49.8 ppm). Die Zuordnungen im vorliegenden Spektrum von Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OH sind gesichert durch die zusätzliche Aufnahme eines gekoppelten Spektrums. Daher ist auch im Aliphatenbereich die Zuordnung von Aib-C_β (26.9, 25.6 (2x) und 24.7 ppm) und Pro-C_γ (25.6 ppm) eindeutig. Bei den Aib-C_β-Signalen gehören mit großer Wahrscheinlichkeit die beiden "äußeren" Resonanzen bei 26.9 und 24.7 ppm zu dem-

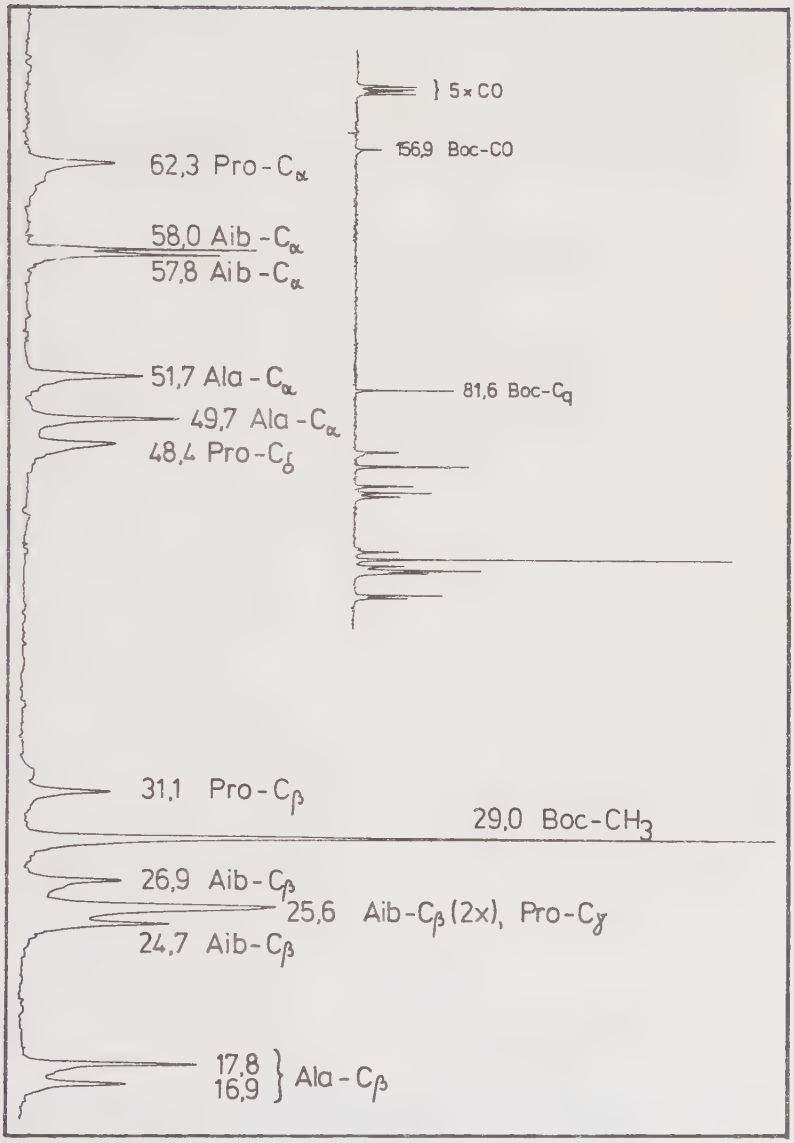


Abb. C.2: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH in $^{12}CD_3OD$, gespreizt. Gesamtspektrum oben links.

selben Aib-Rest, dessen Methylgruppen dann eine MNE von $\Delta\delta$ = 2.2 ppm zeigen, während die C_β-Signale des anderen Aib-Rests magnetisch äquivalent sind. Diese Zuordnung erscheint deshalb gerechtfertigt, da der Mittelpunkt der hoch- und tieffeldverschobenen Aib-Methylgruppen allen verfügbaren Daten zufolge bei 25.3-25.6 ppm liegt.

3. Spektren der Hepta- bis Dekapeptide

Die chemischen Verschiebungen dieser Peptidsegmente sind ebenfalls in Tabelle C.4 zusammengestellt. Die ^{13}C-NMR-Spektren von Boc-14-20 und von Boc-12-20 zeigen im Vergleich zu den bisher diskutierten Spektren eine zunehmende Komplexität, die besonders im Aliphatenbereich die Interpretation erschwert. Dennoch konnte eine befriedigende Zuordnung erreicht werden, da zumindest vom Heptapeptid Boc-14-20 ein Spin-Echo-Experiment vorliegt, welches C_q/CH_2-Gruppen eindeutig von CH/CH_3-Gruppen unterscheidet. Dadurch kann die in Tab. C.4 für Boc-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl gegebene Zuordnung als sicher gelten.

Im folgenden werden vor allem die Zuordnungen und die chemischen Verschiebungen des Nonapeptids Boc-12-20 diskutiert. In den Abbildungen C.3 und C.4 sind sowohl das Gesamtspektrum als auch ein wesentlicher Ausschnitt des Spektrums gespreizt wiedergegeben. Die Kristallstruktur dieses Nonapeptids konnte mit direkten Methoden gelöst werden [76] (Abschnitt D.1.4.).

Die erwarteten 10 Carbonylsignale erscheinen von 178.6 - 173.9 ppm, wobei das Signal bei 175.2 ppm das doppelte Integral besitzt.

Im aromatischen Bereich überlagern sich die Signale vom Phenylalaninol mit denen der Benzylschutzgruppe der Glut-

aminsäure, wobei das Signal bei 139.3 ppm zu Phl-C-1 gehört; Phl-C-3,5 erscheint bei 130.5 ppm, Phl-C-2,6 und Phl-C-4 unterscheiden sich in der typischen Weise um fast 2 ppm.

Oberhalb von 100 ppm treten zunächst bei 80.8 und 67.1 ppm Schutzgruppensignale auf; bei 64.7/64.6 erscheint ein Peak mit breiter Schulter, der laut Integral zu drei Signalen gehört: Phl-CH_2OH und offenbar Pro- und Val-C_α.

Bei höherem Feld (57.9-57.5 ppm) erscheinen die sehr invarianten und immer sehr scharfen Aib-C_α-Signale. Von den vier folgenden C_α-Signalen zwischen 56.8 und 54.4 ppm kann nur ein Glx-C_α aufgrund der Vergleichsspektren einigermaßen sicher zugeordnet werden: 54.4 ppm. Im Boc-14-20 liegen die Resonanzen beider Glx-C_α-Atome bei 55.1 und 54.1 ppm. Phl-C_α erscheint in diesem sehr ähnlichen Spektrum bei 56.0 ppm, Leu-C_α in Boc-12-17-OH bei 54.9 ppm. Da es problematisch zu sein scheint, eine "Reihenfolge" aufzustellen, wenn sich die Absolutwerte ändern, soll hier auf den Schein von Präzision verzichtet werden.

Das Pro-C_δ-Signal bei 50.0 ppm zeigt eine sonderbare Schulter, die aber möglicherweise apparativ bedingt ist, da sie im Gesamtspektrum (Abb. C.3) nicht zu sehen ist.

Leu-C_β (42.0 ppm) und Phl-C_β (38.2 ppm) erscheinen bei den erwarteten ppm-Werten. Die beiden nächsten Resonanzen zu höherem Feld bei 33.0 und 32.1 ppm gehören zu den Glu- und Gln-C_γ-Atomen. Dies geht auch aus dem Vergleich mit Boc-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl hervor. Dagegen ist eine Zuordnung zwischen Val-C_β und Pro-C_β in diesem Feld nicht mit Sicherheit möglich: Die beiden Signale bei 30.3 und 29.9 ppm unterscheiden sich nur um 0.4 ppm. Für 30.3 ppm als "Val-C_β" spricht möglicherweise die größere Invarianz dieses Signals in diesem Bereich gegenüber dem sehr flexiblen Prolinsignal.

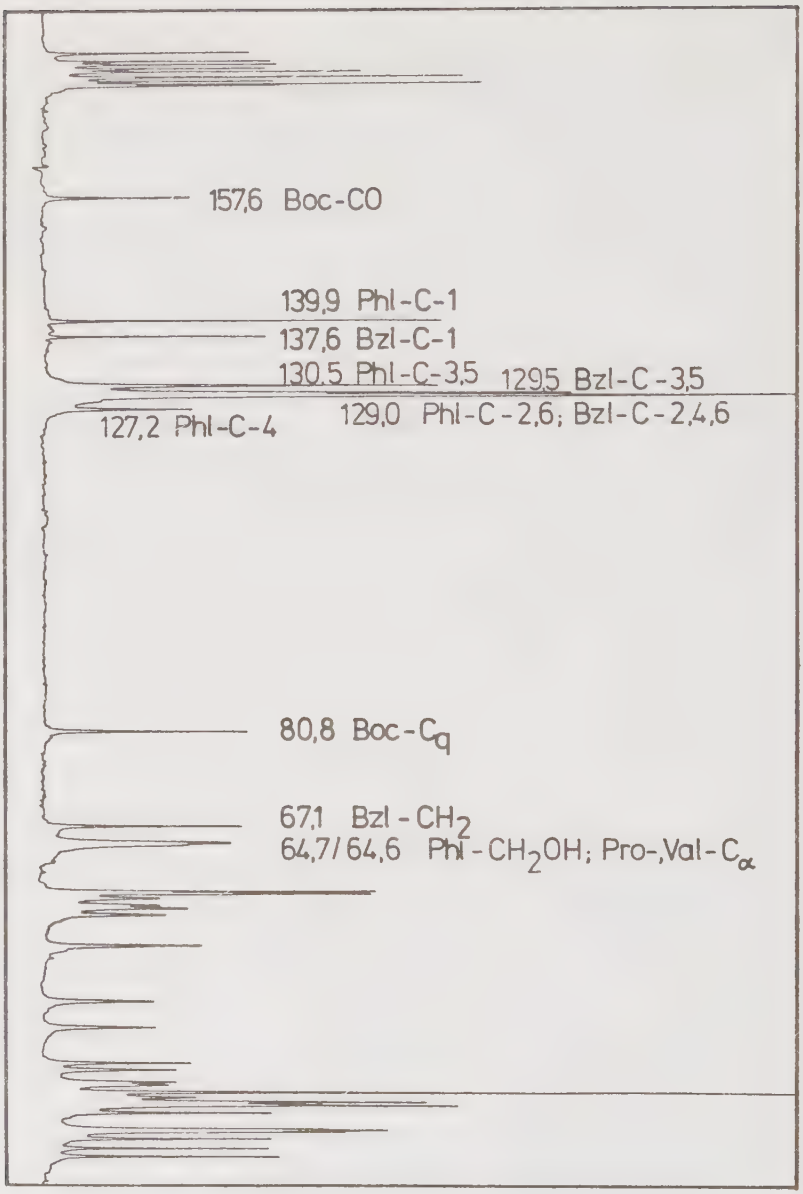


Abb. C.3: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl in $^{12}CD_3OD$

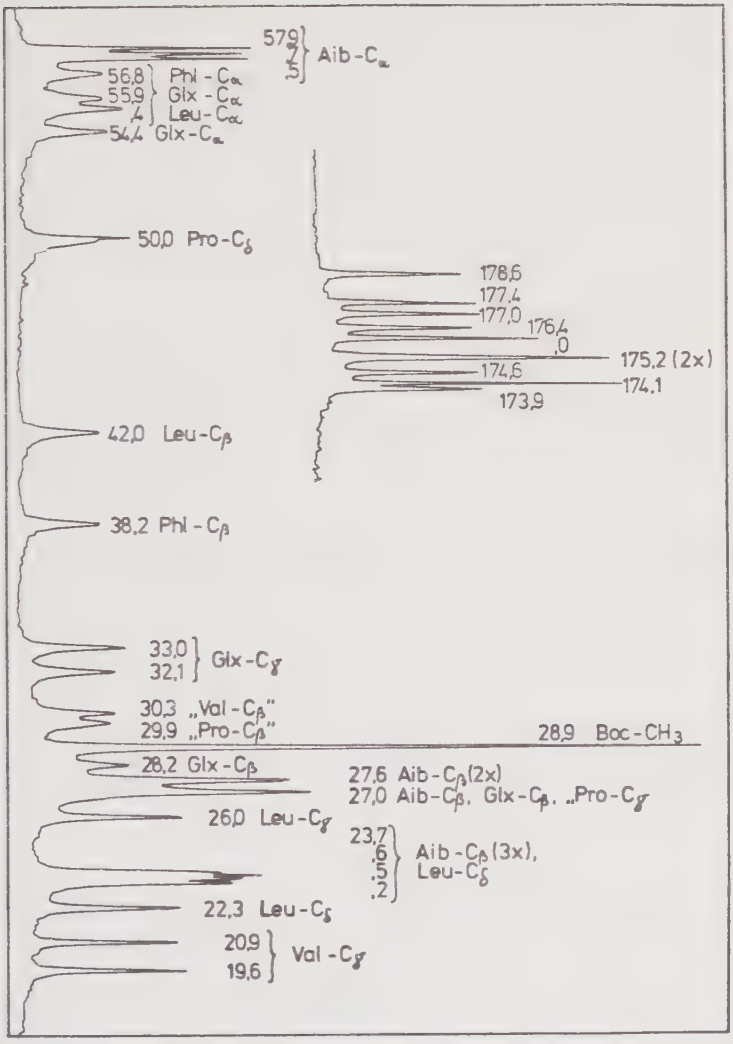


Abb. C.4: Gespreizte Ausschnitte aus dem in Abb. C.3 gezeigten Gesamtspektrum

Die Signale jenseits des dominanten Boc-Methylsignals (28.9 ppm) scheinen sich zunächst einer exakten Zuordnung zu entziehen. Dennoch ist die folgende Charakterisierung mit Hilfe von Vergleichsspektren durchaus plausibel:

1) Die beiden Glx-C_β-Signale erscheinen sowohl im Heptapeptid Boc-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl als auch im Boc-2-20 in unmittelbarer Nachbarschaft des Boc-Signals mit einer Differenz von ca. 1 ppm;

2) Pro-C_γ liegt in -Aib-Pro-Val-Sequenzen bei ziemlich genau 27 ppm;

3) Der Einzelpeak bei 26.0 ppm, der charakteristisch zwischen den beiden Aib-Signalgruppen erscheint, gehört nicht zu einer Aib-Methylgruppe, da es dann ein Peak doppelter Intensität für zwei magnetisch äquivalente Aib-C_β-Methylgruppen sein müßte. Vielmehr handelt es sich um die Leu-C_γ-Resonanz, die nur dann von Aib-C_β-Signalen zu unterscheiden ist, wenn alle Aib-C_β-Atome eine relativ große MNE zeigen. Dies ist hier und bei allen längeren Peptiden zu erwarten.

4) Leu-C_δ- und Val-C_γ-Signale erscheinen bei bekanntem Feld

5) Alle noch nicht zugeordneten Signale gehören zu Aib-C_β-Methylgruppen.

Die aus diesen Beobachtungen resultierende Zuordnung ist in Tab. C.4 und Abb. C.4 zu finden.
Damit ergibt sich eine Aufspaltung der Aib-C_β-Methylgruppen von mindestens $\Delta\delta$ = 4.1 ppm (23.5 ppm - 27.6 ppm), die fast identisch ist mit derjenigen des Alamethicins ($\Delta\delta$= 4.3 ppm). Offensichtlich sind also auch in Lösung alle Aib in einer helikalen Umgebung, wie es die Röntgenstrukturanalyse des Nonapeptids (Abschn. D.1.4.) für den Kristall zeigt.

Beachtenswert ist auch die MNE der beiden Val-C_γ-Methylgruppen von $\Delta\delta$ = 1.3 ppm (20.9, 19.6 ppm). Möglicherweise ist auch diese Aufspaltung auf Wechselwirkungen mit der α-Helix zurückzuführen. Die MNE dieser Valin-Signale entspricht der Aufspaltung von $\Delta\delta$ = 1.4 ppm im ebenfalls α-helikalen Boc-2-11-OH. Demgegenüber unterscheiden sich die Signallagen der Val-C_γ-Methylgruppen meist um weniger als 0.5 ppm (Tab. C.3 und C.4). Eine deutliche Ausnahme bildet jedoch Boc-Val-Aib-OH ($\Delta\delta$ = 1.2 ppm).

Die chemischen Verschiebungen der Dekapeptidsäure Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OH sind ebenfalls in Tab. C.4 aufgeführt.
Der Carbonylbereich zeigt außer den erwarteten CO-Signalen im Bereich von 178.2 bis 173.1 ppm noch ein schwaches Signal bei 164.7 ppm, dessen Herkunft bislang nicht geklärt werden konnte.

Im C_α-Bereich fällt vor allem die Tieffeldverschiebung der beiden Ala-C_α-Signale auf, die hier mit 53.8 und 53.0 ppm sogar beide Alaninsignale betrifft. Demgegenüber ist im Alamethicin nur ein Ala-C_α-Signal bei 53.8 ppm zu finden, das zweite liegt dort aber mit 49.9 ppm fast 4 ppm bei höherem Feld. Das Gly-C_α-Atom zeigt eine starke Hochfeld-Verschiebung zu 36.9 ppm, während noch im Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe das Gly-Signal bei 42.1 ppm auftritt. Dies weist auf eine Protonierung der freien Carboxy-Gruppe hin.

Das Prolin-C_β bei 32.6 ppm ist eine außergewöhnlich breites Signal.

Pro-C_γ wird bei 25.6 ppm zugeordnet, da es sich um ein kleineres Signal handelt, welches sich deutlich in der Peakform von den umgebenden Aib-C_β-Signalen abhebt. Damit

liegt Pro-C_γ exakt gleich wie in den beiden Boc-Prolylpeptiden Boc-2-6-OH und Boc-2-20. Alle übrigen Signale um diesen Peak, von 27.7 bis 23.7 ppm sind Aib-C_β-Methylgruppen, deren MNE von 4.0 ppm unabhängig vom Circulardichroismus (vgl. Abschn. D.2.) auf eine α-helikale Struktur schließen läßt.

4. Spektren von Boc-2-20 und Alamethicin F-30

Die chemischen Verschiebungen der Alamethicinvorstufe Boc-2-20 sowie die des synthetisierten Alamethicins sind in Tabelle C.5 gegenübergestellt. Beide Spektren wurden in größtmöglicher Übereinstimmung mit den Partialsequenzen Boc-2-11-OH und Boc-12-20 zugeordnet. Durch die zusätzliche Information der J-modulierten Spin-Echo-Experimente kann daher in bisher unerreichter Zuverlässigkeit eine Zuordnung getroffen werden. Neben allen anderen physikalischen und biologischen Tests weist die Übereinstimmung des in Abb. C.7 gezeigten Spektrums mit dem des natürlichen Alamethicins [9] auf die erfolgreiche Synthese von Alamethicin F-30 hin.

In den Abbildungen C.5 und C.6 wird das ^{13}C-NMR-Spektrum des geschützten 19-Peptids Boc-2-20 wiedergegeben, die Abbildungen C.7 bis C.11 zeigen das sehr ähnliche Spektrum des Alamethicins mit z.T. gespreizten Bereichen.

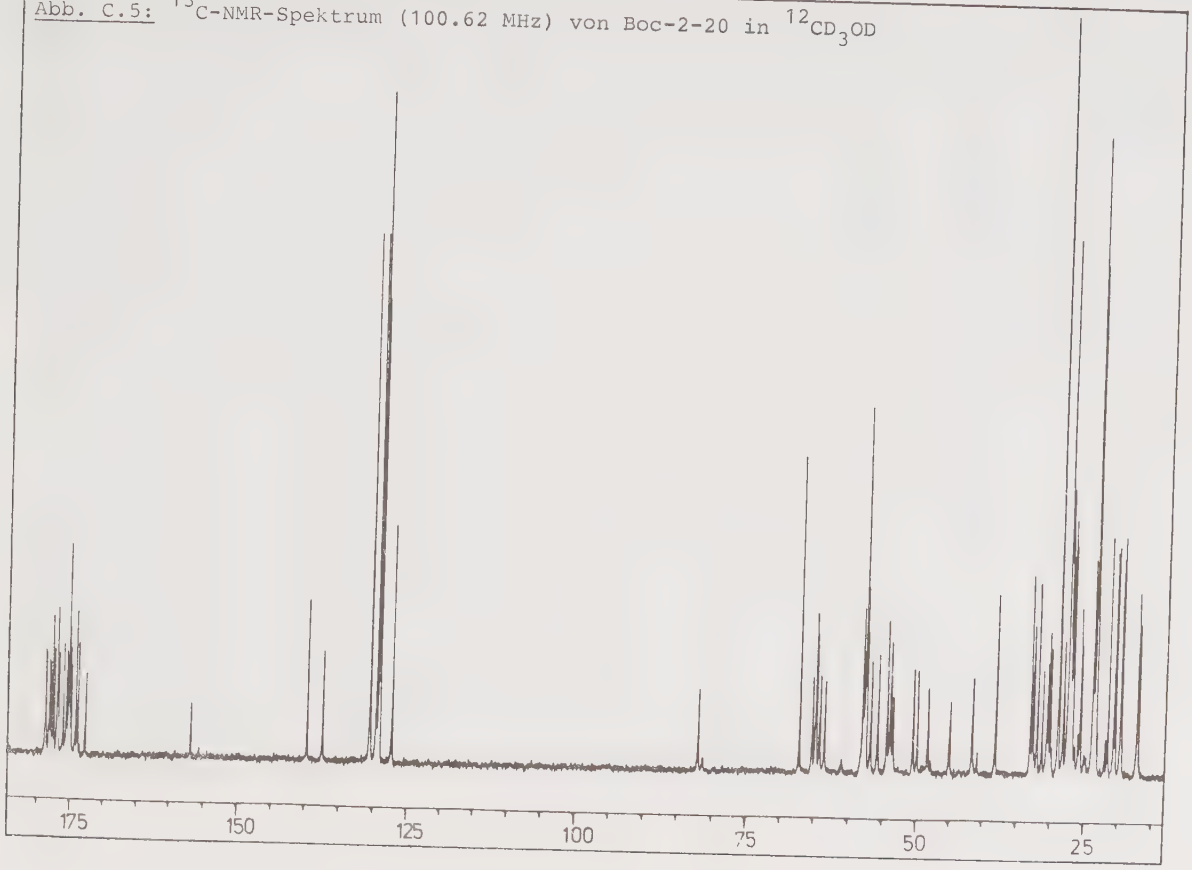
Der Carbonylbereich von 178.8-172.7 ppm umfaßt bei Boc-2-20 erwartungsgemäß 21 CO-Signale, das Boc-CO-Signal (157.2/155.9 ppm) sowie Boc-Cq (81.9/81.2 ppm) zeigen die typische Z/E-Aufspaltung eines Boc-Prolylpeptids. Außerdem sind in der Alamethicinvorstufe zwischen 139.8 und 127.1 ppm deutlich die aromatischen Signale der Benzylester-Schutzgruppe sowie des Phenylalaninols zu beobachten.

Im Alamethicin-Spektrum (Abb. C.7) werden 23 CO-Signale einschließlich Ac-CO erwartet und beobachtet. Wegen der großen Übereinstimmung der Signallagen mit Boc-2-20 wurde das Ac-CO-Signal in Tab. C.5 bei 172.4 ppm angenommen. Bei 64.8 ppm (beide Spektren) ist deutlich die alkoholische Phl-Gruppe zu erkennen, während für die 2 Pro- und 2 Val-C_α-Signale keine exakte Zuordnung getroffen werden konnte.

Im C_α-Bereich sind die quartären Aib-Signale deutlich zu erkennen, sie erscheinen sehr invariant zwischen 58.0 und 57.2 ppm in beiden Spektren. Das CH-Signal bei 57.8 bzw. 57.9 ppm wurde aufgrund des Vergleichs mit Boc-2-11-OH (Tab. C.4) als Gln^7-C_α aufgefaßt, während die beiden C-terminalen Glx-C_α-Signale bei 54.4 und 53.9 ppm (beide Spektren) erscheinen.
Ein bislang nicht erklärter Doppelpeak ist im Alamethicin-Spektrum bei 57.1 ppm zu sehen, wo Phl-C_α erwartet wird. Bemerkenswert ist die erhebliche Differenz der beiden Ala-C_α-Signale von ca. 4 ppm, die im Alamethicin bei 49.9 und 53.8 oder 53.9 ppm erscheinen.

Sehr interessant ist die empfindliche Verschiebung der N-terminalen Prolinsignale beim Übergang vom Boc-Prolylpeptid Boc-2-20 zur Ac-Aib-Pro-Sequenz im Alamethicin. N-terminales Pro^2-C_δ erscheint im Boc-2-20 bei 48.3 ppm, während Pro^2-C_δ im Alamethicin bei 50.0 ppm fast bei dem Wert des mittelständigen Prolins (50.5 ppm, beide Spektren) zu beobachten ist. Ganz ähnlich ist die Annäherung an die Signallagen des mittleren Prolins beim Übergang von Boc-2-20 zum Alamethicin auch bei Pro-C_β und Pro-C_γ (s. Tab. C.5).

Abb. C.5: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz) von Boc-2-20 in $^{12}CD_3OD$



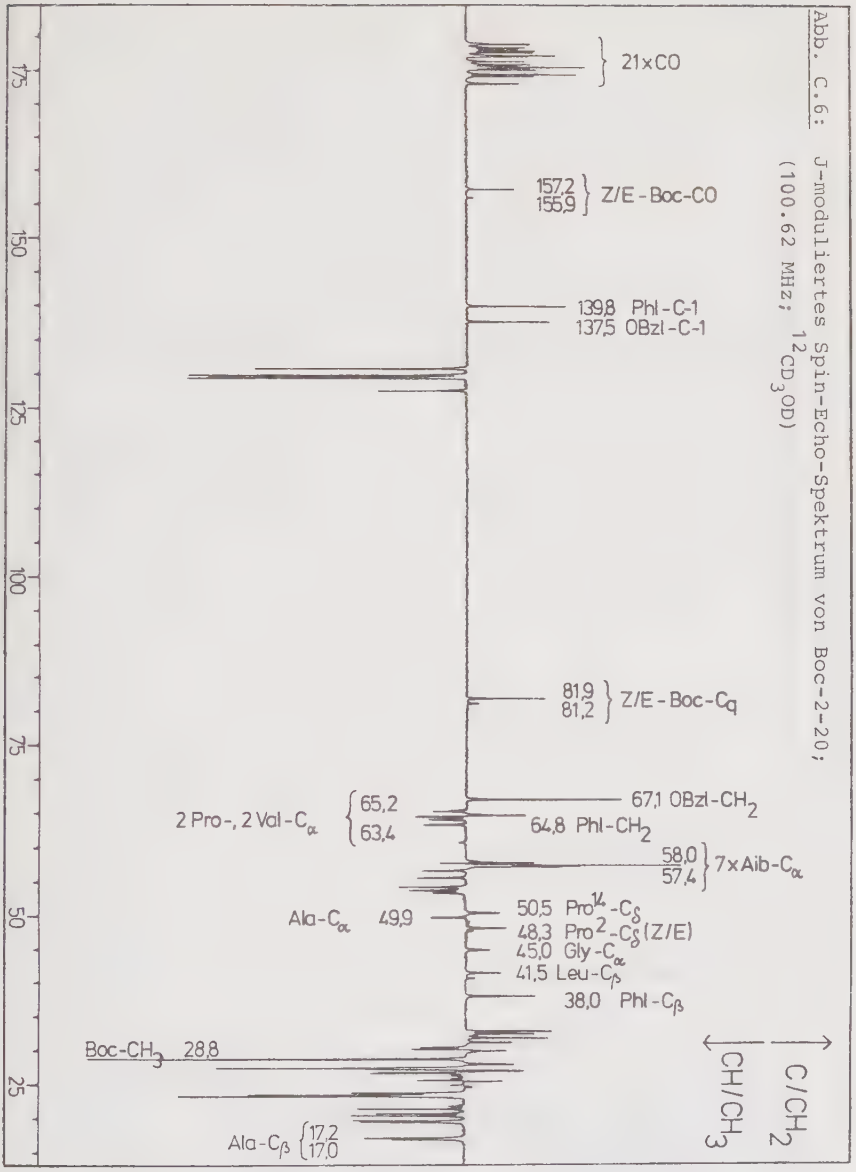


Abb. C.6: J-modulierte Spin-Echo-Spektrum von Boc-2-20; (100.62 MHz; $^{12}CD_3OD$)

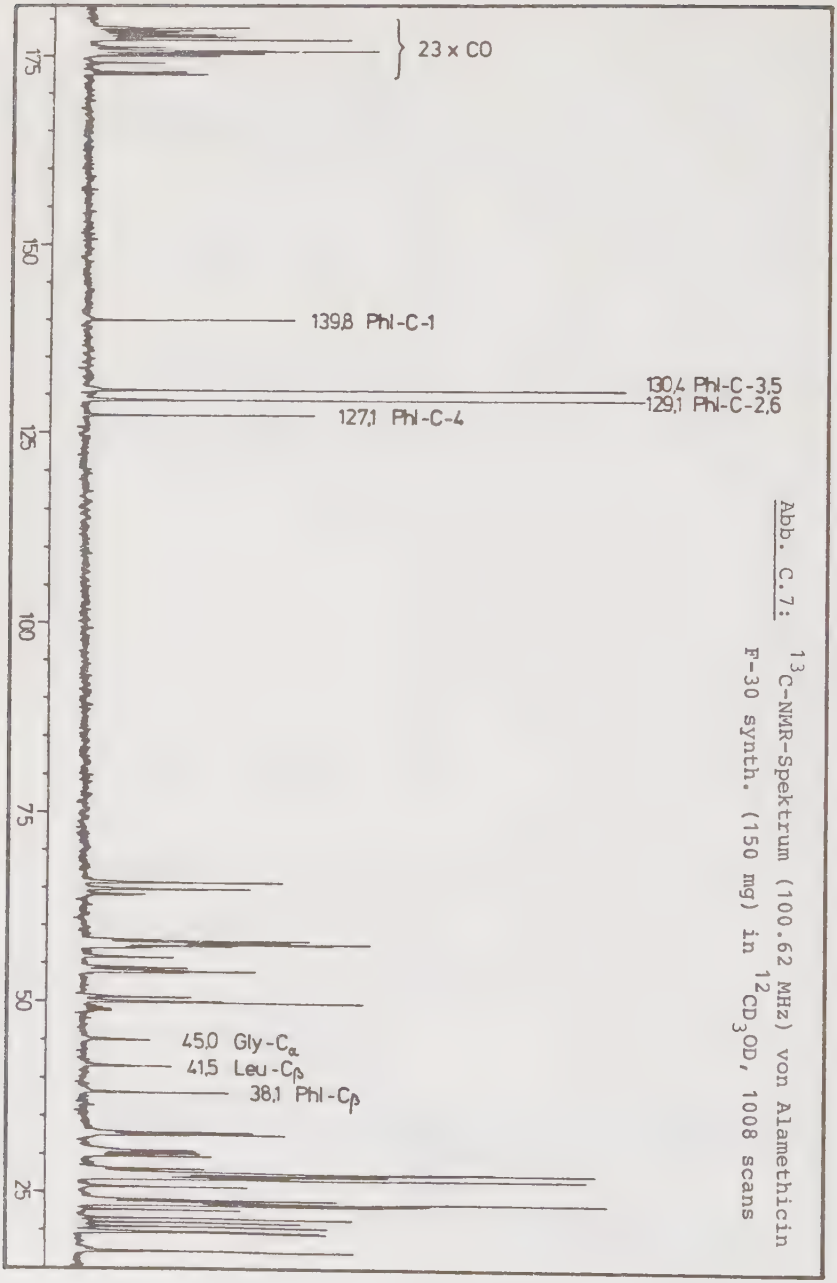


Abb. C.7: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz) von Alamethicin F-30 synth. (150 mg) in $^{12}CD_3OD$, 1008 scans

Wie bei der klaren Unterscheidung zwischen den CH_2-Pro-C_δ (50.0 ppm) und dem CH-Ala-C_α (49.9 ppm) erweist sich das J-modulierte ^{13}C-NMR-Spektrum im Bereich bis zu 27.0 ppm (Abb. C.11) als äußerst nützlich für die Zuordnung. So sind in beiden diskutierten Spektren die C_β-Signale von Glx, Pro und Val wie die C_γ-Signale von Glx und Pro ohne Schwierigkeit zu unterscheiden. Im Bereich der Aib-CH_3-Signale "stören" nur Leu-C_γ und Leu-C_δ. Das Leu-C_γ-Signal liegt aber wie auch bei anderen helikalen Segmenten mit 25.6 ppm ziemlich genau zwischen den je 7 bzw. je 8 nicht-äquivalenten Aib-C_β-Signalgruppen. Für Boc-2-20 und Alamethicin ergibt sich eine MNE der Aib-Methylgruppen von $\Delta\delta$ = 4.2-4.3 ppm.

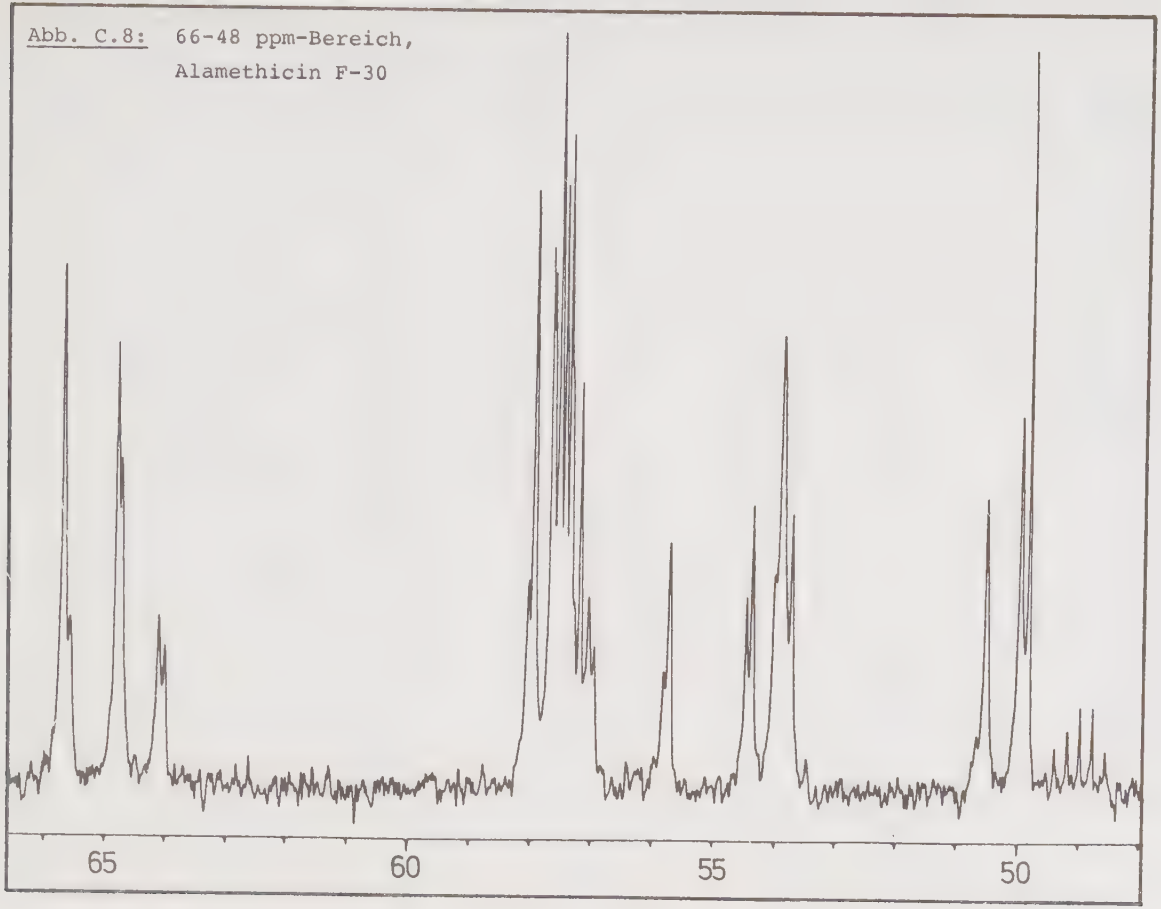
Kürzlich durchgeführte T_1-Relaxationsexperimente (K.-P. Voges, H. Schmitt, unveröffentlicht) weisen für die pro-S-Aib-C_β-Atome (23.9-23.2 ppm) eine Relaxationszeit von 545 $\pm$ 30 msec auf, für die pro-R-Aib-C_β-Atome (27.5-26.7 ppm) die signifikant geringere Relaxationszeit von 260 $\pm$ 30 msec.

Auch die beiden Leu-C_δ-Methylgruppen zeigen eine MNE von mindestens 1.7 ppm. Hierbei wurde angenommen, daß das bei höchstem Feld erscheinende Signal in der Pro-S-Aib-C_β-Gruppe ein Leu-C_δ-Signal ist. Möglicherweise ist auch hier eine Wechselwirkung der Methylgruppen mit der Helix in Betracht zu ziehen; aber da die Leu-C_δ-Methylgruppen von dem Helix-Backbone relativ weit entfernt sind, sind auch andere Effekte denkbar.

Bei höchstem Feld erscheinen in beiden Polypeptiden die Signale von Val-C_γ und Ala-C_β.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die beiden zuletzt diskutierten ^{13}C-NMR-Spektren in voller Übereinstimmung mit den erwarteten Strukturen stehen.

Abb. C.8: 66-48 ppm-Bereich,
Alamethicin F-30



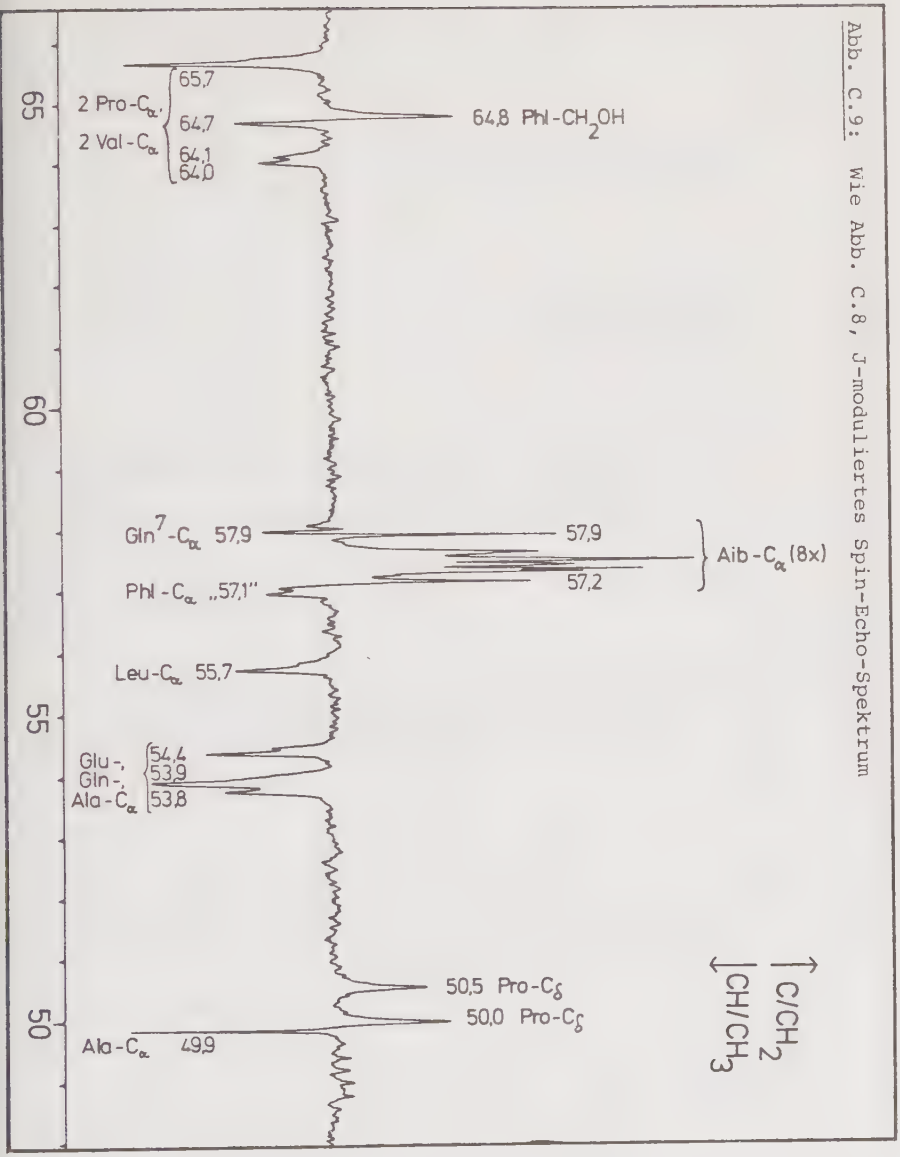
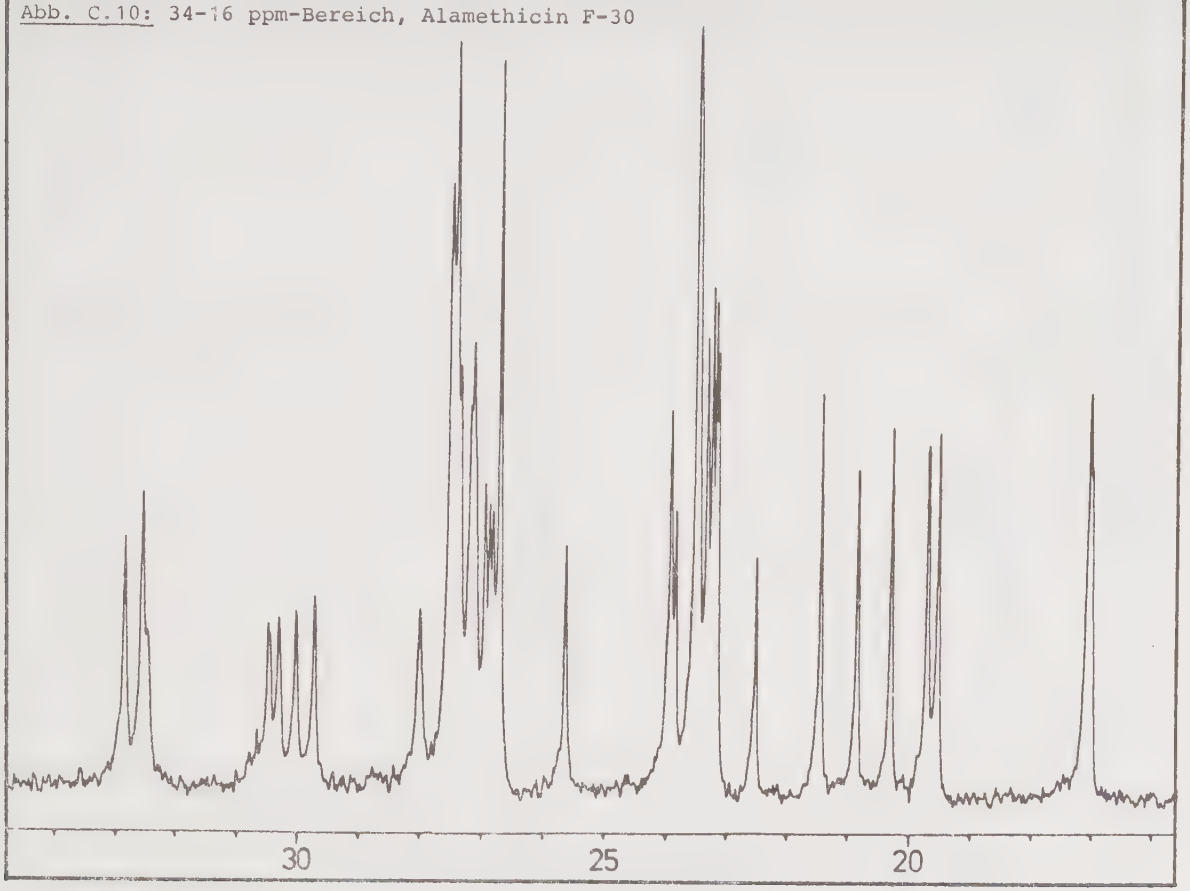


Abb. C.9: Wie Abb. C.8, J-moduliertes Spin-Echo-Spektrum

Abb. C.10: 34-16 ppm-Bereich, Alamethicin F-30



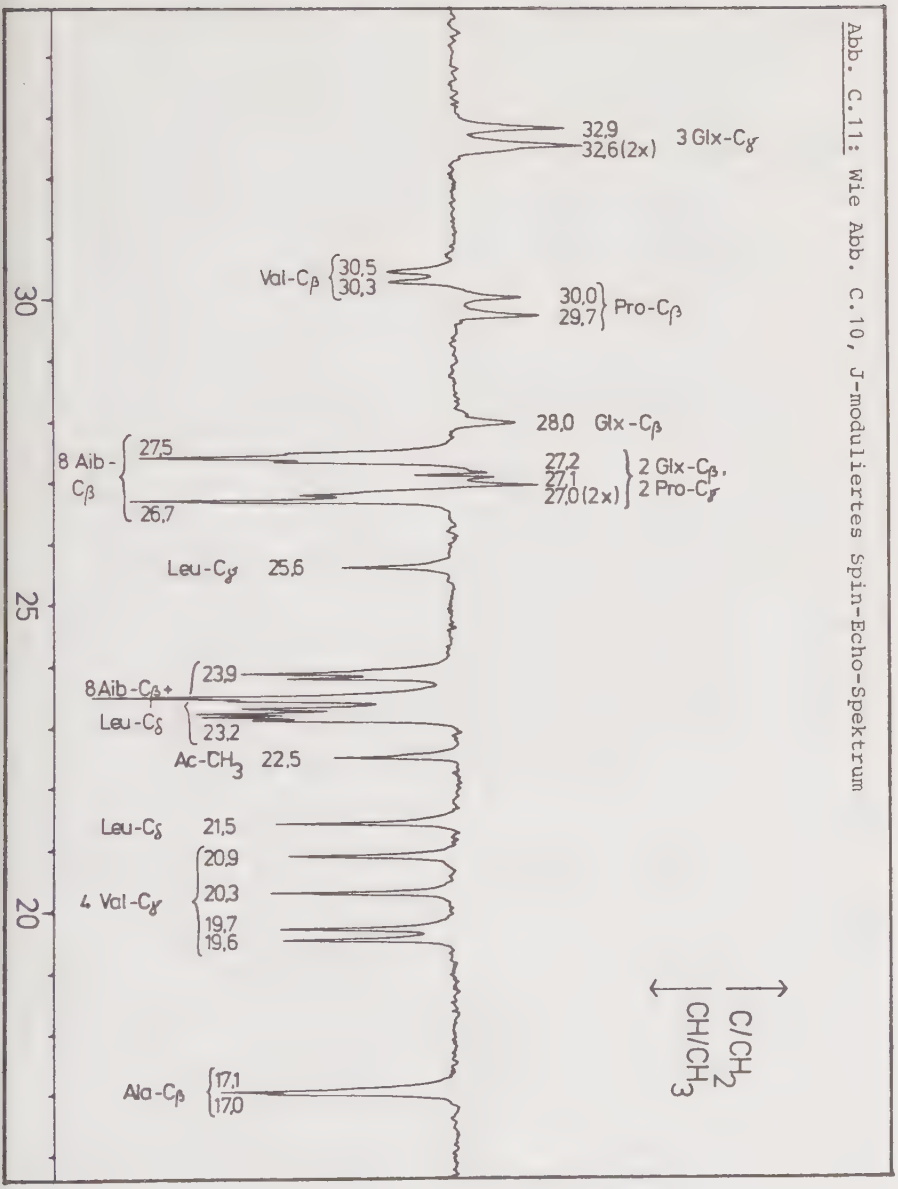


Abb. C.11: Wie Abb. C.10, J-moduliertes Spin-Echo-Spektrum

Tab. C.5: ^{13}C-NMR-Daten von Boc-2-20 und Alamethicin F-30

		Boc-2-20	Alamethicin F-30
CO-Signale		178.8 .7 .2 .0 177.8 .7 .5 .0 176.9 .8 .1 175.6 .5 .3(2x) 175.2 .0 174.9 .2 173.9 172.7 (21xCO)	178.8(2x) .4 .2 177.9 .7 .5 .1(4x 176.2 175.7 .6 .5(3x) 175.2 174.9 .0(2x) 172.7 172.4("Ac-CO") (23xCO)
Aib:	C_α	58.0 57.6(3x) 57.5(2x) 57.4	57.9 57.7(2x) 57.6(2x?) 57.5 57.4(2x) 57.2
	C_β	27.5(4x) 27.3 26.9 26.7 23.8(2x) .5(3x) 23.3(2x)	27.5(2x) 27.4(2x) 27.2 26.8 26.7(2x) 23.9 .8 .5(3x) 23.3 .2(2x)
Pro:	C_α	65.2 - 63.4(2x)	65.7 - 64.0(2x)
	C_β	31.2 (Pro^2) 30.0 (Pro^{14})	30.0 29.7
	C_γ	27.0 (Pro^{14}) 25.6 (Pro^2)	27.0(2x)
	C_δ	50.5 (Pro^{14}) 48.3 (Pro^2)	50.5 50.0
Ala:	C_α	53.5 49.9	53.8 49.9
	C_β	17.2 17.0	17.1 17.0
Glx:	C_α	57.8(Gln^7) 54.4 53.9	57.9(Gln^7) 54.4 53.9
	C_β	28.1 27.2 27.1	28.0 27.2 27.1
	C_γ	32.9 .6 .0	32.9 .6(2x)

Fortsetzung der Tab. C.5

		Boc-2-20			Alamethicin F-30	
Val:	C_α	65.2	-	63.4(2x)	65.7 - 64.0(2x)	
	C_β	30.5	.3		30.5	.3
	C_γ	20.6	.4		20.9	.3
		19.7	.5		19.7	.6
Gly:	C_α	45.0			45.0	
Leu:	C_α	55.7			55.7	
	C_β	41.5			41.5	
	C_γ	"25.7"			"25.6"	
	C_δ	23.3	21.5		23.3	21.5
Phl:	"C_α"	56.8			"57.1"	
	Bzl-CH_2	38.0			38.1	
	CH_2OH	64.8			64.8	
	C_{arom}	139.8			139.8	
		130.5			130.4	
		129.1			129.1	
		127.1			127.1	
"Schutz-gruppen"		157.2/155.9(Z/E-Boc-CO)			"172.4" Ac-CO	
					22.5 Ac-CH_3	
		81.9/81.2 (Z/E-Boc-Cq)				
		28.8 Boc-CH_3;				
		137.5				
		129.5	129.1	129.0		
		67.1 (Bzl)				

Die Interpretation der MNE der 7 bzw. 8 Aib-Methylpaare weist in Übereinstimmung mit röntgenstrukturanalytischen Ergebnissen auf einen hohen Gehalt an α-Helix hin.

D. KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN

1. Röntgenstrukturanalysen

Die besondere Stereochemie der α-Aminoisobuttersäure zeigt sich am deutlichsten in den Kristallstrukturen der bisher untersuchten Aib-haltigen Oligopeptide. Tabelle D.1 zeigt eine Zusammenstellung der durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Oligopeptide, die einen Ausschnitt aus der Alamethicinsequenz darstellen*.

Das auffallendste Strukturmerkmal der aufgeführten Aib-Oligopeptide ist - bei ausreichender Länge des Peptids - die Ausbildung von β-Turns.
Ein β-Turn ("β-bend", "reverse turn", "C_{10}-conformation") ist eine Konformation aus normalerweise vier Aminosäuren, bei der sich die (Poly-)Peptidkette zu sich selbst um annähernd 180° zurückfaltet. Dabei wird eine Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylgruppe des ersten Aminosäurerests und der Aminogruppe des vierten gebildet.
Die H-Brücke wird deshalb als 4 → 1 Bindung bezeichnet. Sie schließt einen 10-gliedrigen Ring, weshalb ein β-Turn bei geeigneter Φ/Ψ-Winkelkombination der Aminosäurereste 2 und 3 zugleich der Beginn einer 3_{10}-Helix sein kann.
Venkatachalam [28] unterschied als erster 3 Typen von β-Turns nach den Φ/Ψ-Winkeln der zweiten und dritten Aminosäure. Fast alle der in Aib-Oligopeptiden beobachteten β-Turns können dem "helikalen" Typ III ($\Phi_{2,3} = -60^\circ$ ($\pm 20^\circ$); $\Psi_{2,3} = -30^\circ$ ($\pm 20^\circ$) zugeordnet werden [21,77].

---

* Für die Hilfe bei der Literatursuche danke ich R. Bosch recht herzlich

Tab. D.1: Teilsequenzen des Alamethicins, deren Kristallstruktur bekannt ist. In Klammern wird die Anzahl der β-Turns angegeben.

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl

Ac-Aib-NHMe(-) [78]
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-OBzl [79]
Boc-Aib-OH(-) [80,81]
Z-Aib-Pro-NHMe(1) [82]
Z-Aib-Pro-Aib-OMe(1) [21]
Z-Aib-Pro-Aib-Ala-OMe(2) [83]
Piv-Pro-Aib-NHMe (1) [84]
Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-OMe [85]
Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-OBzl(2) [31]
pCl-Bz-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe(3) [86]
Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-OH(3)
Boc-Ala-Aib-OH(-) [87]
Ac-Ala-Aib-Ala-OMe("1") [74]
Boc-Ala-Aib-Ala-OMe("1") [88]

Boc-Leu-Aib-Pro-OH(-) [31]
Boc-Leu-Aib-Pro-OBzl(-) [31]
Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-OMe(2) [89]
Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl(3β,3α)
Z-Aib-Aib-oxaz(-) [90]
Z-Aib-Aib-OH(-) [81]
Boc-Aib-Aib-OBzl(-) [91]

Diese Winkelkombinationen unterscheiden sich kaum von denen einer α-Helix ($\Phi = -57^{o}$; $\Psi = -47^{o}$). Aus rein sterischen Gründen sind also beide alternativen Strukturen, 3_{10}- und α-Helix möglich. Der entscheidende Unterschied liegt in der Lage der Wasserstoffbrücken: 4 → 1 bei der 3_{10}-Helix (bzw. beim β-Turn) und 5 → 1 bei der "klassischen" α-Helix.

Das kleinste Molekül, das noch einen β-Turn auszubilden vermag, ist ein geschütztes Dipeptidamid, bei dem die Schutzgruppe und die Amid-NH-Gruppierung die Aminosäuren 1 und 4 ersetzen. Dieser Fall ist verwirklicht im β-Turn von Z-Aib-Pro-NHMe [82], ebenso im Piv-Pro-Aib-NHMe [84].

Generell scheint es ein charakteristisches Merkmal der Aib-Oligopeptide zu sein, innerhalb der sterisch erlaubten Konformationen ein Maximum an intramolekularen H-Brücken auszubilden.
Analog zeigen alle in Tabelle D.1 aufgeführten geschützten Tripeptide einen β-Turn, indem die Urethan-Carbonylgruppe in die H-Brücke einbezogen wird. Die einzige Ausnahme stellt naturgemäß Boc-Leu-Aib-Pro-OH/OBzl dar, da hier wegen Prolin in Position "4" ein sekundäres Amid vorliegt und somit keine H-Brücke möglich ist.

Die längsten Partialsequenzen des Alamethicins, deren Kristallstrukturen bisher aufgeklärt wurden, sind Pentapeptide, die entsprechend bis zu drei aufeinanderfolgende β-Turns aufweisen und damit eine 3_{10}-helikale Struktur besitzen. Darüber hinaus wurden 3_{10}-Helices auch in Boc-$(Aib\text{-}Ala)_2$-Aib-OMe [92], Z-$(Aib)_5$-OBu^t [93], Tos-$(Aib)_5$-OMe [94] und in Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe [95] gefunden*.

---

* Vor kurzem veröffentlichten Francis et al. [96] sogar die 3_{10}-helikale Konformation des Dekapeptids Boc-Aib-Pro-Val-Aib-Val-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe. Dieses Molekül stellt somit die längste bisher bekannte 3_{10}-Helix dar.

Bis zu welcher Länge und bei welchen Sequenzen eine 3_{10}-Helix die günstigste Konformation darstellt, ist bislang nicht zu entscheiden. Wie wir jedoch durch die Röntgenstrukturanalyse des Undekapeptids Boc-Ala-(Aib-Ala)$_2$-Glu(OBzl)-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe zeigen konnten, bildet sich in längeren Aib-Peptiden keine 3_{10}- sondern eine α-Helix [33,34]. Dieser Befund wurde von Fox und Richards [35] durch die Röntgenstrukturanalyse des Alamethicins bestätigt: Das 20-Peptid kristallisiert fast über seine gesamte Länge in α-helikaler Sekundärstruktur.

Die Bedeutung der β-Turns sozusagen als "3_{10}-Helix-Bildner" ist eine Besonderheit, die im wesentlichen auf die ungewöhnlich eingeschränkte Stereochemie der Aib-Peptide zurückzuführen ist. Aufeinanderfolgende β-Turns des Typs III sind unseres Wissens auch nur an α,α-Dialkylaminosäuren gefunden worden.

Es sei aber abschließend darauf hingewiesen, daß in den letzten Jahren die Bedeutung der (isoliert vorkommenden) β-Turns als Strukturmerkmale für die Faltung von Polypeptid- und Proteinketten mehr und mehr erkannt worden ist [97]. Chou und Fasman [29] fanden z.B. in 29 Proteinen eine durchschnittliche Häufigkeit von β-Turns von 32 %, verglichen mit 38 % Helices und 20 % β-Faltblattstrukturen.

Im Folgenden werden kurz die Ergebnisse derjenigen Röntgenstrukturanalysen referiert, die von R. Bosch [98] und Prof. Dr. W. Winter an kristallinen Synthese-Zwischenprodukten durchgeführt wurden.

1.1. Kristallstruktur von Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$OH

Von der Pentapeptidsäure Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH wurde durch Kristallisation aus Essigester/Petrolether u.a. ein Einkristall von etwa 0.25 x 0.25 x 0.2 mm erhalten. Die Zell-

parameter sind a = 18.839(3), b = 18.776(7), c = 9.179(1) Å und $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$. Der vermessene Einkristall hat die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12$.
Die Abbildung D.1 zeigt die 3_{10}-helikale Struktur mit drei 4 — 1 H-Brücken zwischen O2 - N3, O3 - N4 und O4 - N5. Damit bildet diese Pentapeptidsäure die maximal mögliche Anzahl von aufeinanderfolgenden β-Turns, indem die Boc-CO-Gruppe als Akzeptor der ersten H-Brücke fungiert. Dies entspricht fast zwei Windungen einer 3_{10}-Helix.

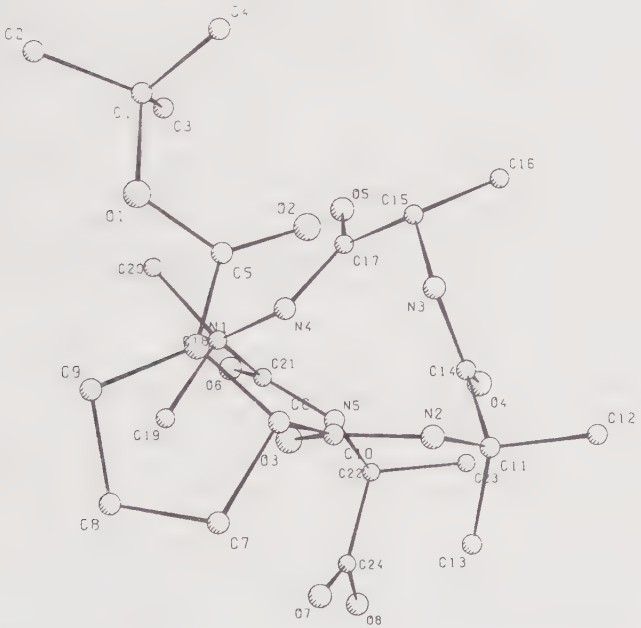


Abb. D.1: Räumliche Darstellung von Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH mit Numerierung der Atome

Tabelle D.2 zeigt die Torsions-Winkel der fünf Aminosäurereste:

Tab. D.2: Torsions-Winkel in Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OH

	ϕ	ψ	ω
Pro (1)	- 57.9	+ 135.6	180.0
Aib (2)	+ 56.3	+ 26.8	+ 178.5
Ala (3)	+ 58.1	+ 26.9	180.0
Aib (4)	+ 60.9	+ 35.9	+ 166.2
Ala (5)	- 97.2	+ 162.4	(+ 80.7)

Auffallend ist die Schraubenrichtung der Helix. Während normalerweise die L-Konfiguration der Aminosäuren zu einer rechtsgängigen Helix führt, wird hier eine linksgängige Helix beobachtet (3^L_{10}). Im Gegensatz dazu zeigt Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-OBzl [31] interessanterweise die umgekehrte Schraubenrichtung.
Beachtenswert ist weiter, daß im Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OH eine trans-Urethan-Amid-Bindung vorliegt, während fast alle Boc-Pro-Derivate mit der entsprechenden cis-Konformation kristallisieren [99]. Dies ist offenbar damit zu erklären, daß nur in dieser trans-Konformation die Ausbildung des ersten β-Turns möglich wird.
Von Cameron et al. [86] wurde die Kristallstruktur von p-Cl-Bzl-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-OMe beschrieben. Das Peptid unterscheidet sich nur in den Schutzgruppen von der vorliegenden Pentapeptidsäure. Auch dort findet sich neben der trans-Urethanbindung eine aus drei β-Turns bestehende linksgängige 3_{10}-Helix. Man kann also davon ausgehen, daß die Schutzgruppen hier - wie auch in vielen anderen Beispielen - keinen spürbaren Einfluß auf die Peptidkonformation ausüben.

Die beiden Tripeptide Boc-Ala-Aib-Ala-OMe [88] und Ac-Ala-Aib-Ala-OMe [74] können als Teilsequenzen von Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-OH aufgefaßt werden. Beide Tripeptide zeigen deformierte β-Turns mit relativ schwachen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen.

1.2. Kristallstruktur von Boc-Val-Aib-Aib-OMe

Der geschützte Tripeptidester kristallisierte aus Essigester/Petrolether. Ein geeigneter Einkristall von etwa 0.18 x 0.5 x 0.4 mm Größe wurde verwendet, um die Zellparameter zu bestimmen: Boc-Val-Aib-Aib-OMe kristallisiert höchstwahrscheinlich in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit a = 11.56(2), b = 18.974(3) und c = 25.866(9) Å.

Da es sich zeigte, daß für eine Strukturanalyse ungünstig viele Moleküle in der asymmetrischen Einheit enthalten waren, wurde von einer Röntgenstrukturanalyse dieses Tripeptidesters abgesehen.

1.3. Kristallstruktur von Boc-Pro-D-Val-OH

Aus einem Kupplungsansatz von Boc-Pro-L-Val-OH und H-Aib-Aib-OH wurde kristallines Boc-Pro-D-Val-OH isoliert (siehe Teil B).
Ein Einkristall von etwa 0.4 x 0.4 x 0.2 mm Größe wurde zur Röntgenstrukturanalyse verwendet. Die Dipeptidsäure kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit a = 9.426(1), b = 11.876(1) und c = 16.085(1) Å.

Abbildung D.2 zeigt die Struktur von Boc-Pro-D-Val-OH.

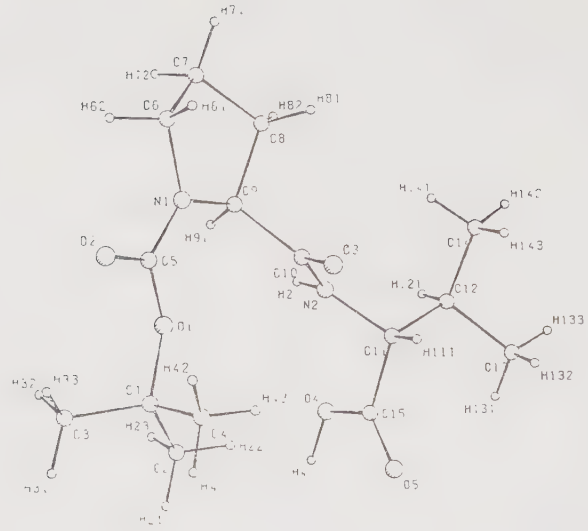


Abb. D.2: Räumliche Darstellung von Boc-Pro-D-Val-OH

Es werden keine intramolekularen H-Brücken beobachtet, vielmehr bilden sich intermolekulare Wasserstoffbrücken von N2 nach O3' und von O4 nach O2'.

Im Gegensatz zu Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH liegt hier eine cis-Konformation der Urethan-amid-Bindung vor, wie es der Mehrzahl aller beobachteten Boc-Prolyl-peptide entspricht.

1.4. Kristallstruktur von Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl (Boc-12-20)

Durch Abdunsten einer methanolischen Lösung wurde ein Einkristall des Nonapeptids Boc-12-20 erhalten, der eine Größe von etwa 0.5 x 0.5 x 1.0 mm besitzt. Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit a = 15.666(6), b = 16.192(2) und c = 25.876(3) Å.

Abbildung D.3 zeigt eine perspektivische Darstellung des Nonapeptids Boc-12-20. Jedes Molekül liegt fast vollständig als Helix vor; die einzelnen Helices sind durch intermolekulare H-Brücken kopf - schwanz-verknüpft. Die Besonderheit der vorliegenden Struktur besteht in der Art der Helix: Betrachtet man nur intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, deren O---H-Abstand weniger als 2.55 Å beträgt, so ergibt sich folgendes Bild:

O3	— NH4	(3_{10})	(2.489 Å)
O3	— NH5	(α)	(2.002 Å)
O4	— NH6	(α)	(2.211 Å)
O5	— NH7	(α)	(2.363 Å)
O7	— NH8	(3_{10})	(2.315 Å)
O8	— NH9	(3_{10})	(2.537 Å)

Es handelt sich also um keine reine α- oder 3_{10}-Helix. Vielmehr ist der Mittelteil des Moleküls vorherrschend eine α-, der C-Terminus eher eine 3_{10}-Helix. Zusätzlich bilden fast alle Amid- und Carbonylgruppen noch eine weitere H-Brücke aus. Manche dieser "zweiten" H-Brücken sind nicht mehr als 0.2 Å länger als die oben aufgeführten. Dieses Phänomen der gegabelten H-Brücken ist am deutlichsten ausgeprägt zwischen NH9 und O8 bzw. O7 (2.537 bzw. 2.624 Å).

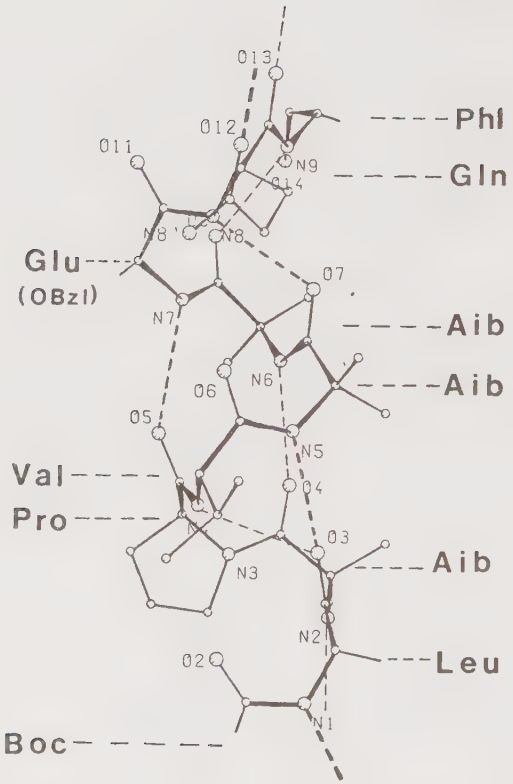


Abb. D.3a: Räumliche Darstellung von Boc-12-20

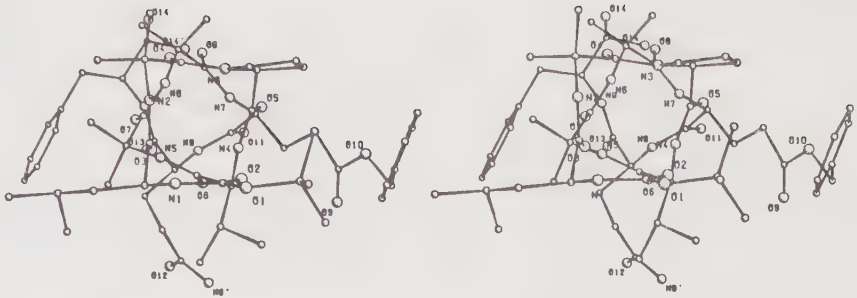


Abb. D.3b: Stereo-Darstellung von Boc-12-20; Blickrichtung entlang der Helixachse vom N-Terminus zum C-Terminus

O3 bildet zu NH5 und NH4 (s.o.) sogar noch stärkere Bindungen. Die Wasserstoffbrücken-Bindungen sind in Abb. D.4 schematisch dargestellt.

Die Position des Prolins als dritte Aminosäure verhindert keine α-Helixwindung, da eine 5 → 1 H-Brücke erst von der Valin-Aminogruppe ausgebildet werden kann. Demgegenüber wird ein erster 3_{10}-Turn von Boc-CO zu N3 durch die Stellung des Prolins in der Sequenz unmöglich.

Die Φ/Ψ-Winkelkombinationen der einzelnen Aminosäurereste sind in Tab. D.3 zusammengefaßt.

Tab. D.3: Torsions-Winkel in Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl

	Φ	Ψ	Ω
Leu (1)	- 63.3	- 45.2	- 167.7
Aib (2)	- 54.0	- 51.4	- 178.2
Pro (3)	- 70.1	- 29.9	+ 176.8
Val (4)	- 61.1	- 48.5	+ 180.0
Aib (5)	- 57.9	- 48.0	- 171.0
Aib (6)	- 58.4	- 37.9	- 177.5
Glu (7)	- 64.0	- 33.7	- 178.3
Gln (8)	- 72.8	- 29.6	- 175.4
Phl (9)	- 119.3		

Das Nonapeptid Boc-12-20 stellt die längste kristallographisch untersuchte Teilsequenz des Alamethicins dar und bestätigt die von Fox und Richards [35] am Gesamtmolekül gemachte Beobachtung, daß entgegen unseren früheren Erwartungen auch der C-Terminus des Alamethicins helikal vorliegt. Darüber hinaus stellt die Röntgenstrukturanalyse

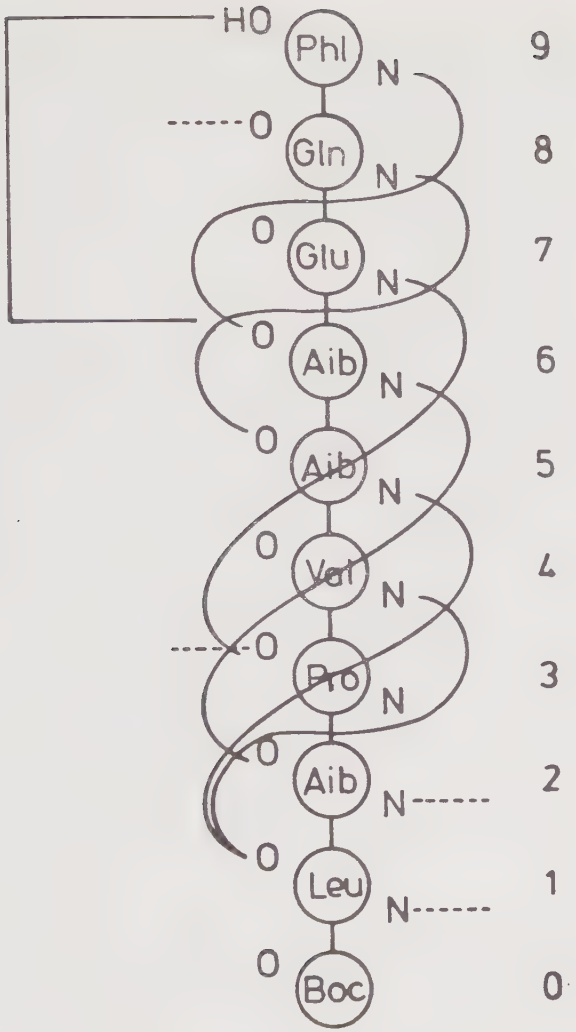


Abb. D.4: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken-Bindungen in der Kristallstruktur von Boc-12-20

dieses Peptids für die vorliegende synthetische Arbeit einen Strukturbeweis für diese schwierigere C-terminale Hälfte des Alamethicins dar.

2. Circulardichroismus (CD)

2.1. CD von Peptiden

Jedem der drei Grundtypen der Konformation [100] (α-Helix, β-Faltblatt und "ungeordnete" ϱ-Konformation) kann eine mehr oder weniger charakteristische CD-Kurve zugeordnet werden. Als Modellsubstanzen dienen Poly-α-aminosäuren, die möglichst nur in einer dieser Standardkonformationen vorliegen. Auf diese Weise fand man für die rechtshändige α-Helix einen negativen Cotton-Effekt bei 223 nm, der durch einen nπ*-Übergang der Peptidbindung verursacht wird [101]. Der kurzwelligere ππ*-Übergang ist für die α-Helix in charakteristischer Weise aufgespalten in eine positive Bande bei 192-194 nm und eine negative Bande bei 207-208 nm. Das Auftauchen dieser beiden Cotton-Effekte mit entgegengesetzten Vorzeichen ("exciton-splitting") wurde nur bei der α-Helix beobachtet und kann theoretisch begründet werden mit der unterschiedlichen Richtung der Übergangsmomente parallel und senkrecht zur Helix-Achse [102,103].

Polypeptide mit antiparalleler β-Faltblattstruktur weisen im CD-Spektrum ein Minimum bei 215-220 nm auf (nπ*-Übergang) sowie ein Elliptizitätsmaximum bei 195 nm (ππ*-Übergang).
Bei Molekülen mit "ungeordneter Konformation" [104,105] liegen Polypeptidketten vor, die ohne eine periodische Ordnungsstruktur fest zueinander fixiert sind und dadurch Cotton-Effekte hervorrufen. In dieser sogenannten ϱ-Kon-

formation ändert sich die räumliche Orientierung der Ketten nicht wesentlich mit der Zeit und außerdem liegen alle Moleküle in hauptsächlich der gleichen Konformation vor. Nach Rosenkranz und Scholtan [105] ist das CD-Spektrum von Poly-L-Serin bei hohem Salzgehalt für die ℘-Konformation charakteristisch. Es zeigt einen starken negativen Cotton-Effekt bei 195 nm und ein schwaches Elliptizitäts minimum bei 222 nm.

Die Berechnung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen mit Hilfe des Circulardichroismus beruht auf einem Vergleich der experimentell erhaltenen CD-Spektren mit den oben erwähnten Modellspektren für die drei Standardkonformationen. Um quantitative Aussagen über die prozentualen Anteile von α-, β- und ℘-Konformation zu erhalten, faßt man das zu interpretierende Spektrum als überlagertes Spektrum der drei Grundtypen auf. Mit Hilfe eines Computerprogramms wird dann diejenige Linearkombination berechnet, die dem experimentellen CD-Spektrum am ehesten entspricht. (Umgekehrt wurde natürlich zuerst die Brauchbarkeit der Modellspektren getestet, indem man Konformationsberechnungen an Proteinen durchführte, deren Struktur durch Röntgenstrukturanalyse bekannt ist.)
Methoden zur Konformationsberechnung aus CD-Daten wurden, um nur einige wenige Autoren zu nennen, von Greenfield und Fasman [106], Rosenkranz und Scholtan [105] und Chen et al. [107] entwickelt.

Vor allem eine solche quantitative Auswertung des Circulardichroismus zur Sekundärstrukturbestimmung von Oligopeptiden und kürzeren Polypeptiden - wie sie hier synthetisiert wurden - ist nicht unproblematisch. Die aus Polypeptiden bzw. Proteinen gewonnenen Standard-Elliptizitäten, aus denen z.B. der Prozentsatz an α-Helix abzuleiten wäre, erscheinen nur bedingt übertragbar auf unsere kurz-

kettigen Peptide, die zudem bis zu 50 % aus der achiralen α-Aminoisobuttersäure bestehen. Eine Einschränkung in der Verwendung der oben zitierten Rechenprogramme besteht außerdem darin, daß die von den "klassischen" Standards abweichenden Konformationen wie vor allem β-Turns [28,29] und 3_{10}-Helices [108] nicht berücksichtigt werden. Gerade diese beiden Strukturmerkmale sind jedoch bei Aib-Oligopeptiden begünstigt [77,21].

Dennoch ist der Circulardichroismus vor allem dann eine aussagekräftige Methode, wenn eine der Standardkonformationen deutlich überwiegt. Dies trifft für die untersuchten Peptaibol-Antibiotika wie Alamethicin und dessen Analoga mit ihrem ausgeprägten α-Helixcharakter ausnahmslos zu.

Aber auch die sukzessive Ausbildung einer helikalen Struktur in einer wachsenden Peptidkette läßt sich mittels CD recht gut verfolgen [109,110]. Betrachtet man die CD-Spektren einer solchen im Syntheseverlauf wachsenden Kette vom Oligopeptid zum Polypeptid(antibiotikum), so zeigt sich auch ohne quantitative Analyse an der z.T. drastischen Veränderung der Spektren, daß der Circulardichroismus empfindlich die Ausbildung der Sekundärstruktur widerspiegelt.
Aus diesen Gründen hat sich der Circulardichroismus trotz aller Vorbehalte als sehr nützlich erwiesen, um Aussagen über die Sekundärstruktur Aib-haltiger Polypeptidantibiotika und diverser Partialsequenzen in Lösung machen zu können [22,26,27,71,109,110].

2.2. CD-Spektren

Das CD-Spektrum des geschützten Tripeptidesters Boc-Val-Aib-Gly-OMe (Abb. D.5) zeigt im kurzwelligsten erfaßten Bereich unterhalb 220 nm einen starken positiven Cotton-

Effekt, dessen Maximum jenseits von 200 nm aus apparativen Gründen nicht mehr erfaßt werden konnte. Im langwelligeren Bereich von 220-240 nm zeigt die Verbindung einen sehr schwachen Cotton-Effekt. Das starke Elliptizitätsmaximum bei oder unterhalb 200 nm ist ein auffallendes Merkmal dieses Spektrums und spricht nicht nur für eine sehr starre Konformation des Tripeptids, sondern für das Vorliegen eines β-Turns.
Für diese Annahme sprechenden folgende Beobachtungen:

a) die große Ähnlichkeit des vorliegenden Spektrums mit den von Woody [111] für β-Turns berechneten CD-Spektren (schwaches Minimum bei 225 nm, Nulldurchgang bei 220 nm und starkes Elliptizitätsmaximum bei 202-208 nm),

b) die Ähnlichkeit mit publizierten CD-Spektren [112-114], die als charakteristisch für β-Turns angesehen werden,

c) die durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesenen β-Turns vieler Aib-Oligopeptide, insbesondere in Boc-Gly-Ala-Aib-OMe [115] und Ac-Ala-Aib-Ala-OMe [74],

d) die für ein Tripeptid außergewöhnlich hohe magnetische Nichtäquivalenz (MNE) der beiden Aib-C_β-Methylgruppen im ^{13}C-NMR-Spektrum von $\Delta\delta$ = 1.9 ppm (vgl. Abschn. C.1.).

Das CD-Spektrum von Boc-Pro-$(Aib-Ala)_2$-OH (Abb. D.5) zeigt insgesamt einen ähnlichen Verlauf wie das oben beschriebene Tripeptid mit einer bathochromen Verschiebung des Nulldurchgangs von 5 nm, jedoch mit erheblich geringeren Elliptizitätswerten. Diese Tatsache ist vor allem deshalb erstaunlich, weil durch die Röntgenstrukturanalyse dieser Pentapeptidsäure gezeigt werden konnte, daß im kristallinen Zustand drei aufeinanderfolgende β-Turns vorliegen, die dem Molekül eine 3_{10}-helikale Struktur verleihen.

Bei der Interpretation dieses Spektrums muß aber berücksichtigt werden, daß die Kristallstruktur eine unübliche

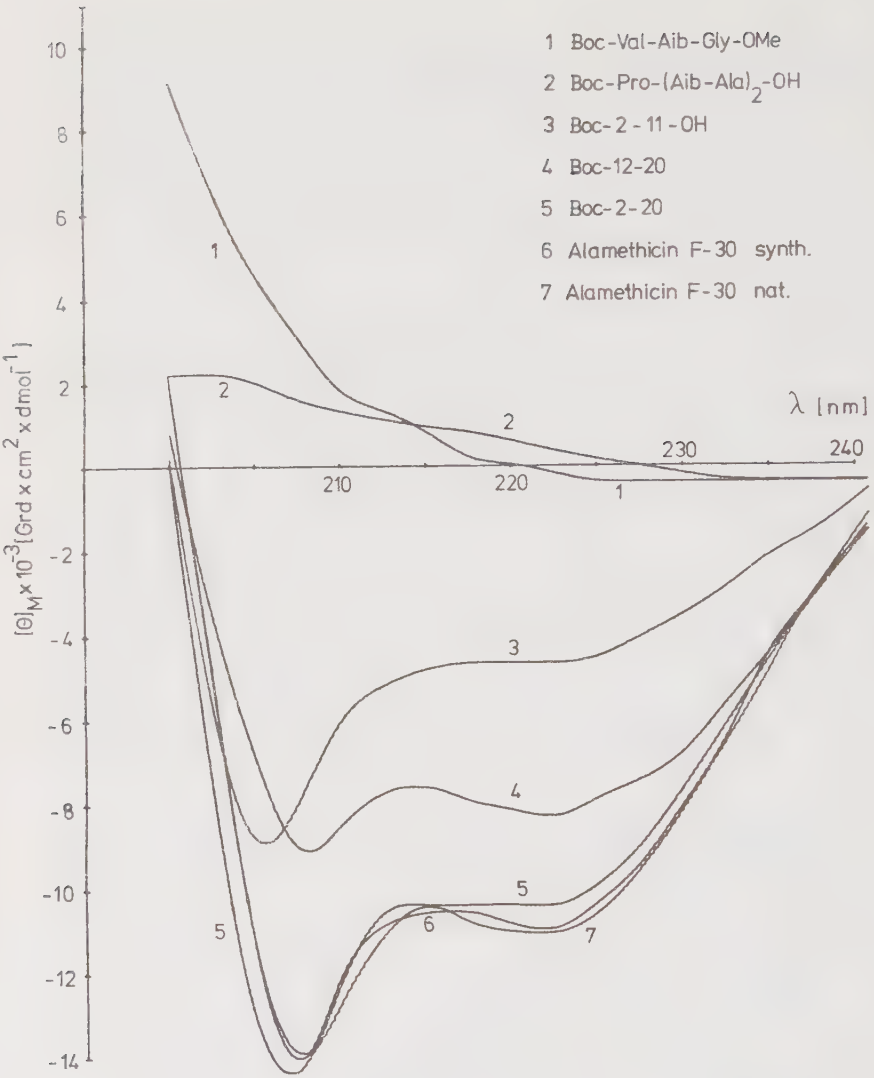


Abb. D.5: CD-Spektren der Verbindungen 1 bis 7 in Ethanol (95 %) Uvasol (Konz. ca. 1 mg/ml), T = 10°C

linksgängige (3^{L}_{10}) Helix aufweist. Interessant ist deshalb ein Vergleich mit dem CD-Spektrum der spiegelbildlichen 3^{R}_{10}-Helix in Boc-(Aib-Ala)$_2$-Aib-OMe [110,92]. Dieses Pentapeptid zeigt einen schwachen positiven Cotton-Effekt bei 225 nm (Θ_M = $1.5 \cdot 10^{-3}$ Grad·cm^2·dmol^{-1}), einen Nulldurchgang bei 217 nm und einen starken negativen Cotton-Effekt bei 199 nm ($9.5 \cdot 10^{-3}$ Grad·cm^2·dmol^{-1}). (T = 25°C, c = 5 x 10^{-4} mol/l, Ethanol (95 %) Uvasol). Dieser sehr stark von Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH differierende Verlauf der CD-Kurve kann nicht ohne weiteres experimentelles Vergleichsmaterial interpretiert werden.

Die drei CD-Spektren von Boc-Val-Aib-Gly-OMe, Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH und Boc-(Aib-Ala)$_2$-Aib-OMe werfen beispielsweise folgende Fragen auf:

a) gibt es ein charakteristisches CD-Spektrum des Typ-III-β-Turns?

b) ist das CD-Spektrum von aufeinanderfolgenden β-Turns (3_{10}-Helix) mit dem eines einzelnen β-Turns vergleichbar?

c) welchen Einfluß hat die Schraubenrichtung einer 3_{10}-Helix auf den CD?

d) bleiben die im Kristall beobachteten Strukturen auch in Lösung erhalten?

Durch systematische CD-, ^{1}H- und ^{13}C-NMR- und vor allem kristallographische Untersuchungen sind in dieser Hinsicht weitere Ergebnisse zu erwarten.

Das Dekapeptid Boc-2-11-OH zeigt α-helikalen Charakter: Minima bei 205 und 222.5 nm.

Das C-terminale Nonapeptid Boc-12-20 (Abb. D.5) zeigt einen negativen Cotton-Effekt bei 207.5 nm und ein zweites schwächeres Minimum bei 220 nm. Somit spricht auch das

CD-Spektrum für eine helikale Struktur in Lösung. Es ist bis heute umstritten, ob eine 3_{10}-helikale Konformation aufgrund ihres CD-Spektrums von einer α-Helix unterschieden werden kann. Gerade bei dem vorliegenden Nonapeptid könnte diese Frage in Zukunft weiter untersucht werden, da die Röntgenstruktur (s. Abschnitt D.1.4.) dieser Verbindung eine Zwitterform beider Helices erwiesen hat. Möglicherweise läßt sich durch Lösungsmittelwechsel,Änderung der Temperatur, der Konzentration oder der Ionenstärke eine Stabilisierung von 3_{10}- oder α-Helix erreichen.

Die helikale Struktur von Boc-12-20 stellt insofern eine Überraschung dar, als Mayr [53] im CD-Spektrum von Boc-12-19-OPOE keinen Hinweis auf eine Helix finden konnte. Dieses um Phenylalaninol ärmere, polymergebundene Oktapeptid zeigt zwar auch einen negativen Cotton-Effekt bei 205 nm, den nπ*-Übergang allerdings erst bei 231 nm, so daß man nicht mehr von einer α-Helix sprechen kann. Dennoch sei daran erinnert, daß laut Fox und Richards [35] auch im C-Terminus des Alamethicins teils eine α-, teils eine 3_{10}-Helix vorliegt.

Die Alamethicin-Vorstufe Boc-2-20 (Abb. D.5) zeigt ein dem Alamethicin bereits sehr ähnliches CD-Spektrum. Es tritt ein negatives Elliptizitätsmaximum bei 207.5 nm auf, welches ein wenig stärker ausgeprägt ist als beim Alamethicin, während der negative Cotton-Effekt des nπ*-Übergangs bei etwa 222 nm etwas geringere Elliptizitäten aufweist.

Synthetisches und natürliches Alamethicin F-30 (Upjohn) unterscheiden sich innerhalb der Fehlergrenzen des Circulardichroismus in keiner Weise. Beide Proben zeigen die bekannten Cotton-Effekte einer α-helikalen Konformation.

E. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT UND MEMBRANMODIFIZIERENDE WIRKUNG

1. Spannungsabhängige Porenbildung in planaren Lipid-Doppelschichtmembranen

Die Bildung ionenleitender Membranporen durch das synthetisierte Alamethicin F-30 stellt die vielleicht interessanteste Anwendung des hier beschriebenen Syntheseprodukts dar. Die beobachteten Strom-Spannungs-Charakteristika einermit ALA synth. dotierten Membran zeugen nicht nur von der erfolgreichen Synthese, sondern ermöglichten

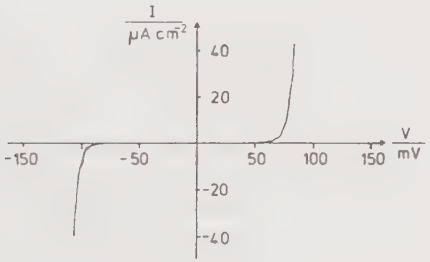


Abb. E.1: Strom-Spannungs-Charakteristik einer mit natürlichem bzw. synthetischem Alamethicin F-30 dotierten Lipid-Doppelschichtmembran: An der Bohrung (Fläche 2×10^4 μm^2) eines mit Hexadekan vorbehandelten Sandwich-Teflon-Septums [116] aus einer Lösung von 2 mg Lipid pro ml Lösungsmittel (Hexan/Ethanol 9:1); Lipid: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin (1.2-POPC; Avanti, Birmingham,USA); Elektrolyt: 1 M KCl, pH 6; Temp.: 20°C; ALA: c = 0.2 $\mu g/cm^3$

der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Boheim, Bochum*, auch erstmals die Aufnahme von äußerst homogenen Leitwerten einer Einzelpore des nicht durch natürliche Analoga verunreinigten Ionophors.

Abbildung E.1 zeigt die Strom-Spannungs-Charakteristik sowohl des natürlichen als auch des synthetischen Alamethicins; beide zeigen innerhalb der Meßungenauigkeit die gleiche (reversible) Abhängigkeit des Membranstroms (Prof. Dr. G. Boheim, pers. Mitteilung) von der angelegten Gleichspannung. Zur Durchführung dieses Experiments wurde der Ionophor nur in ein Kompartiment zur sog. cis-Seite der Membran gegeben. Der positive Strom fließt von der cis-Seite der Membran (Plus-Pol) zur trans-Seite (Minus-Pol).

Man beachte die Asymmetrie der Strom-Spannungskurve, die zwanglos durch das Flip-Flop-Gating-Modell [49] (s. Abschn. A.1.3.) erklärt werden kann.

Aussagekräftiger als die Betrachtung der makroskopischen Leitfähigkeit ist die zeitliche Verfolgung der Leitwertfluktuationen einer Einzelpore. Bei nur geringer Alamethicin-Zugabe zur cis-Seite der Membran kann bei konstanter, geeigneter Membranspannung die Aktivität einer einzigen Pore in Form von sprunghaften Änderungen des Membranstroms beobachtet werden. Abbildung E.2 zeigt die Leitwertfluktuationen einer solchen Einzelpore des synthetischen Alamethicins F-30. Es treten verschiedene Stufen auf, die keine ganzzahligen Vielfache voneinander darstellen: eine Pore variablen Durchmessers, die mehrere Leitwerte annehmen kann.

---

* Mein Dank gilt Prof. Dr. G. Boheim für die Durchführung der Bilayer-Experimente und ganz besonders Herrn Dipl.-Physiker Christoph Methfessel für die hilfreichen Diskussionen.

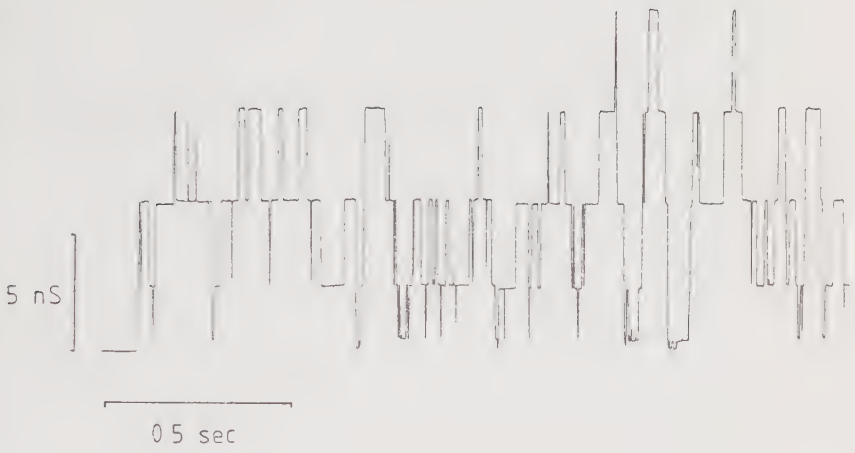


Abb. E.2: Leitwertfluktuationen einer von synthetischem Alamethicin F-30 gebildeten Einzelpore
Lipid: 1.2-POPC/bakterielles Cephalin (9:1);
Elektrolyt: 3 M KCl + 10 mM Tris x HCl, pH 7.0;
Alamethicin: c = 5 nM im cis-Kompartiment;
Temperatur: + 20°C; angelegte Gleichspannung:
+ 130 mV

Typisch für Alamethicin ist die relative Stabilität der einzelnen Porenzustände. Dagegen wird z.B. bei Trichotoxin A-40 zwar eine spannungsabhängige Ionenleitung beobachtet, aber nur in Form sog. Bursts, die instrumentell nicht auflösbar sind.

Besonders beachtenswert an der in Abb. E.2 gezeigten Spur ist aber die bis heute auch bei natürlichem Alamethicin noch nie demonstrierte Einheitlichkeit der Leitwertniveaus. Abbildung E.3 zeigt deutlich die äußerst scharfe Verteilung der auftretenden 6 Leitwerte. Wir führen die Homogenität der Leitwerte auf die Reinheit des synthetisierten Produkts zurück, welches im Gegensatz zu dem aus Trichoderma viride isolierten Produkt keinerlei Mikroheterogenität aufweist.

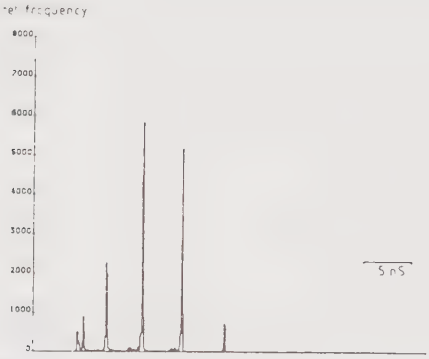


Abb. E.3: Verteilung der Leitwertniveaus der mit ALA synth. dotierten Membran. Aufnahembedingungen s. Abb. E.2

In diesem Zusammenhang ist die kürzlich von Vodyanoy et al. [117] publizierte Einzelporen-Stromfluktuation von angeblich durch HPLC hochgereinigtem Alamethicin bemerkenswert. Wegen der dort auftretenden Inhomogenität der Leitwerte ist anzunehmen, daß entweder die Meßbedingungen

oder aber die Reinigung dieser "Fraktion 4" deutlich schlechter waren als bei unserer in Abb. E.2 gezeigten Aufnahme.

Dennoch ist die Reinheit des Porenbildners wahrscheinlich eine zwar notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für das Auftreten von solch homogenen Leitwerten, wie das Beispiel von Boc-2-20 zeigt (s.u.).

Unter den im Verlauf der Alamethicinsynthese dargestellten Zwischenprodukten richtet sich auf die 19-Peptid-Vorstufe, das geschützte Boc-2-20, das größte Interesse an Porenuntersuchungen.
Abbildung E.4 zeigt die Leitwertfluktuationen einer mit Boc-2-20 dotierten Membran (a) sowie die entsprechende Verteilung der Leitwerte (b).

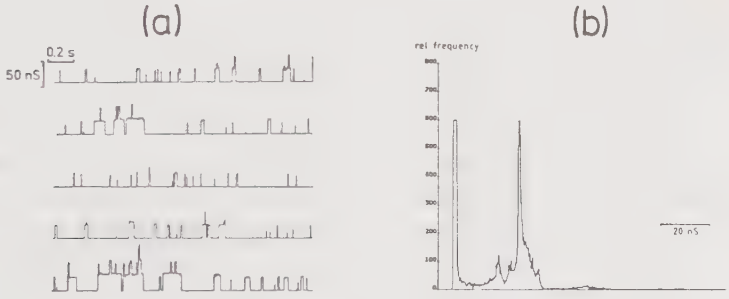


Abb. E.4: Leitwertfluktuationen (a) und Verteilung der Leitwerte (b) einer von Boc-2-20 gebildeten Einzelpore (100 nM).
Lipid: 1.2-POPC; angelegte Gleichspannung: + 330 mV; übrige Bedingungen wie in Abb. E.2

Überraschenderweise treten nur ein bis zwei Leitwerte auf, die aber so hohe Leitfähigkeiten zeigen, wie sie für das achte und neunte Niveau des Alamethicins gefunden werden. Zur Erzeugung der oben abgebildeten Spur wurde zudem die 20-fache Konzentration und eine höhere Spannung benötigt.

Damit zeigen die beiden in ihrer Sequenz fast identischen Polypeptide einen bemerkenswerten Unterschied bezüglich ihrer Porenbildung. Möglicherweise ist die von Alamethicin stark differierende Lipophilie des geschützten 19-Peptids mitverantwortlich für diesen Befund. Aufgrund der Glu^{18}-γ-OBzl-Gruppe besitzt Boc-2-20 in Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (65:25:3:4) einen R_F = 0.76 gegenüber dem merklich hydrophileren Alamethicin mit R_F = 0.57.

Eine Theorie jedoch, die die sehr komplexen Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der spannungsabhängigen Porenbildung erklären könnte, konnte bis jetzt noch nicht formuliert werden.

2. Antibiotische Eigenschaften

Synthetisches Alamethicin F-30 wurde im Plattendiffusionstest mit natürlichem F-30 (Upjohn) verglichen. Wir wählten als Teststämme die auch von Irmscher [36] herangezogenen Bakterien Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus*. Letzterer erhielt ein besonderes Interesse dadurch, daß das von Balasubramanian et al. [15] synthetisierte Alamethicin im Gegensatz zum natürlichen Produkt keine Aktivität gegen S. aureus zeigte. Demgegenüber berichteten

---

* Für die Durchführung des Plattendiffusionstests danke ich Frau U. Schneider recht herzlich.

Gisin et al. [14], daß ihr Syntheseprodukt gegen S. aureus eine Hemmung bewirkte.

In Tabelle E. 1 sind die Ergebnisse des Plattendiffusionstests zusammengefaßt. Es wurden Filterrondelle (Durchmesser 6 mm) verwendet, die mit ethanolischen Lösungen des natürlichen (Upjohn) und des synthetischen Polypeptidantibiotikums getränkt waren.

Gegen B. subtilis wurde sowohl auf einem Komplex- als auch auf einem Minimalmedium getestet. Die nach einer Inkubationszeit von 24 h vermessenen Hemmhöfe zeigen die deutliche Übereinstimmung beider Produkte hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität gegen beide Stämme.

Zusätzlich zu Alamethicin F-30 wurde die geschützte Synthesevorstufe Boc-2-20 unter den gleichen Bedingungen getestet. Überraschenderweise erwies sich Boc-Pro-$(Aib\text{-}Ala)_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib_2-Glu(OBzl)-Gln-Phl als völlig inaktiv gegen beide Teststämme. Offenbar ist die antibiotische Aktivität äußerst empfindlich an strukturelle Voraussetzungen geknüpft, die dieses in der Sequenz fast identische,aber etwas lipophilere 19-Peptid nicht erfüllt. Außerdem scheint aufgrund dieses Befundes kein einfacher direkter Zusammenhang zwischen der antibiotischen Aktivität des Peptids und seiner (vorhandenen) Fähigkeit zur spannungsabhängigen Porenbildung (s. Abschn. E.3.) zu bestehen.

Tab. E.1: Antibakterielle Wirkung von Alamethicin F-30 im Plattendiffusionstest
KM = Komplexmedium, MM = Minimalmedium; Temp.: 37°C; Inkubationszeit: 24 h

	Aufgetragene Menge der Stammlösung (c = 1.0 mg/ml)	Absolutmenge pro Rondelle	Hemmhof ALA synth.	Hemmhof Upjohn
Staphylococcus aureus:	10 µl	5 nmol	8 mm	8 mm
	20 µl	10 nmol	10 mm	10 mm
Bacillus subtilis:	10 µl	5 nmol	9 mm (KM)	10 mm (KM)
			15 mm (MM)	15 mm (MM)
	20 µl	10 nmol	12 mm (KM)	12 mm (KM)
			16 mm (MM)	16 mm (MM)

3. Stimulation der Guanylat-Cyclase aus Paramecium*

Kürzlich wurde beobachtet, daß Alamethicin F-30/50, Suzukacillin A, Melittin und Gramicidin S die in der Cilienmembran von Paramecien (Pantoffeltierchen) lokalisierte Guanylat-Cyclase aktivieren [39]. Bei diesem Enzym (EC 4.6.1.2.) handelt es sich um einen neuen Typ einer Ca^{2+}-abhängigen Guanylat-Cyclase, die das calciumbindende Protein Calmodulin als Untereinheit enthält. Offenbar ist die ausgeprägte Amphiphilie des Alamethicins und der anderen oben genannten aktivierenden Polypeptide eine wichtige Voraussetzung für ihre Wirkung auf das membrangebundene Enzym [39]. Die Erklärung für die Stimulierung der Guanylat-Cyclase kann nicht einfach in der Fähigkeit dieser Verbindungen, Ionen zu transportieren, begründet sein; einerseits ist Gramicidin S kein Ionophor und andererseits erwiesen sich Ionophore wie z.B. Valinomycin und Gramicidin A als inaktiv.

Synthetisches Alamethicin F-30 wurde unter denselben Bedingungen wie das erstmals von Irmscher und Jung [18] isolierte Alamethicin F-50 getestet. Innerhalb einer Fehlergrenze von $\pm$ 5 % ergab sich eine identische Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Guanylat-Cyclase von Paramecium.

Abbildung E.5 zeigt die Aktivierung durch Alamethicin (F-30/50) im Vergleich mit der durch Suzukacillin A und Trichotoxin A-40 bewirkten. Sowohl das synthetische als auch natürliches (F-50) Alamethicin zeigen eine dosisab-

---

* Für die Durchführung dieser Tests danke ich Frau Dr. S. Klumpp und Prof. Dr. J. Schultz, Tübingen

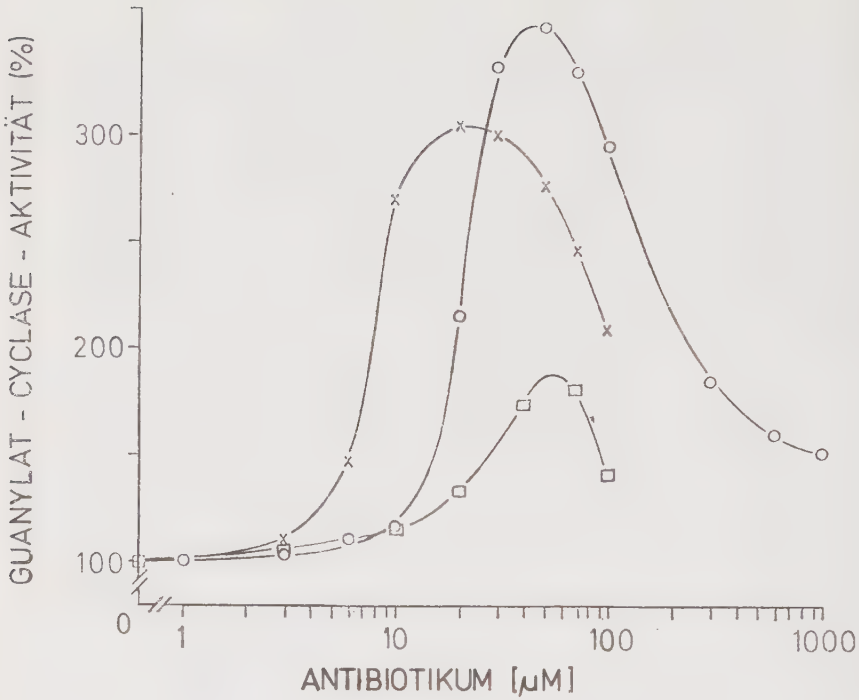


Abb. E.5: Die Wirkung von Alamethicin F-30/50 (o), Suzukacillin (x) und Trichotoxin (□) auf die Aktivität der Guanylat-Cyclase aus den Cilien von Paramecium. Die Aktivität von 100 % entspricht einer Bildung von 1763 pmol cGMP/min x mg^{-1}. Aktivitäts-Bestimmung: 8 min bei 37°C. Totalvolumen: 90 µl mit 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 3 mM $MgSO_4$, 3 mM Phosphoenolpyruvat, 1.25 U Pyruvat Kinase, 1 mM cGMP, 0.44 mM GTP einschließlich 0.5-1 µCi (α-^{32}P)GTP und 10-40 µg Membranprotein

hängige Stimulierung, die bei 50 µM mit der 3.5-fachen Zunahme der Enzymaktivität den höchsten Wert erreicht. Bei höheren Konzentrationen wird das Enzym möglicherweise durch die detergensähnliche Wirkung der Polypeptide denaturiert, so daß eine weitere Erhöhung der Polypeptidzugabe zu einer geringeren Aktivierung führt.

Die identische Aktivierung durch synthetisches und natürliches Alamethicin (in diesem Fall F-50, da die Ergebnisse von natürlichem F-30 noch nicht vorliegen) zeigt einmal mehr die Übereinstimmung des Syntheseprodukts mit dem aus Trichoderma viride isolierten Alamethicin in biologischen Tests und Bilayer-Membran-Experimenten.

F. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Chemikalien und Methoden

Alle Lösungsmittel wurden, sofern nicht p.a. von der Fa. Merck bezogen, nach üblichen Methoden getrocknet und destilliert. N-Methylmorpholin (Merck) wurde zur Beseitigung sek. Amine über Ninhydrin destilliert. Die Aminosäuren (außer Aib, Sigma) stammten von der Fa. Merck.

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} (Merck); Fließmittelsysteme:

I = 1-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1)
II = Chloroform/Methanol/Wasser (80:18:2)
III = Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak/Wasser (65:35:3:4)
IV = Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (65:25:3:4)
V = Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4)

Sprühreagentien: 0.3 proz. Ninhydrin-Lösung in 1-Butanol/Eisessig (100:3) und Chlor/4,4'-bis-(dimethylamino)diphenylmethan [118]. Als Referenzsubstanz diente Dicyclohexylharnstoff: R_F(I) = 0.91, R_F(II) = 0.76, R_F(III) = 0.91, R_F(IV) = 0.83, R_F(V) = 0.81.

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Merck, Korngröße 0.040-0.063 mm; Säule 55 x 3 cm), Sephadex LH-20 (Säule 75 x 3 cm); Detektion mittels DC.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie: SP 8000 A liquid chromatograph + spectrophotometric detector Model 770, 210 nm, der Fa. Spectra-Physics.

Die Schmelzpunkte wurden nach Tottoli ermittelt und sind nicht korrigiert.

Aminosäureanalyse: Die Peptide wurden mit 6 N HCl 24 h bei 110°C hydrolysiert und die Aminosäuren des Hydrolysats mit einem automatischen Chromatographie-System LC 6000 E der Fa. Biotronik bestimmt*.
Die Enantiomerenreinheit der hydrolysierten Aminosäuren wurde gaschromatographisch an Chirasil-Val-Kapillarsäulen [67] bestimmt. Dazu wurden die Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester hergestellt. Die ermittelten Prozentanteile an D-Aminosäuren sind, sofern nicht angegeben, nicht auf hydrolysebedingte Racemisierung [67] korrigiert.

Elementaranalysen: C,H,N-Einfachbestimmungen mit dem Elemental-Analyzer Modell 1104 (Carlo Erba, Mailand)**

Circulardichroismus: Dichrograph Roussel-Jouan CD 185. Die CD-Daten sind als circulardichroitische Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_M$ berechnet; Phl wurde als Aminosäurerest berücksichtigt.

Optische Drehwerte: Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer. Schichtdicken: 10 cm und 1 cm (nur Alamethicin F-30)

NMR-Spektroskopie: Kernresonanzspektrometer WP-80 (20.115 MHz für ^{13}C) und WM 400 (100.62 MHz für ^{13}C) der Fa. Bruker-Physik (Karlsruhe).

---

* Für die Durchführung dieser Analysen danke ich Frau M. Munari, Tübingen.

** Herrn Wurmstich, Tübingen, danke ich für diese Analysen

2. Darstellung der Aminosäurederivate

Die Darstellung der Boc-Aminosäuren erfolgte durch Umsetzung mit Boc-N_3 nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel [119] mit Ausnahme der Synthese von Boc-Aib-OH; dieses wurde nach Moroder et al. [120] mittels Di-tert.-butyldicarbonat (Aldrich) dargestellt.
Boc-Glu(OBzl)-OH wurde als DCHA-Salz aus H-Glu(OBzl)-OH nach F. Drees [121] dargestellt. Ac-Aib-OH wurde nach H. Brückner et al. [122] erhalten.

Aminosäuremethylester wurden mit Thionylchlorid in Methanol [123] dargestellt, Tos x H-Aib-OBzl durch azeotrope Destillation analog zu L. Zervas et al. [124]. L-Phenylalaninol wurde durch Reduktion von HCl x H-Phe-OEt mit $NaBH_4$ [65] erhalten.

3. Darstellung der Di- und Tripeptide

Z-Gln-Phl

Zu Z-Gln-OH (2.8 g, 10 mmol) in CH_2Cl_2/DMF (1:1) (30 ml) wurde bei -15°C zuerst NMM (1.15 ml, 10 mmol) und dann Chlorameisensäureisobutylester (1.38 ml) tropfenweise zugegeben, so daß die Temperatur nicht über -13°C anstieg. Nach 15 min wurde eine vorgekühlte Lösung von Phl (1.66 g, 11 mmol) in CH_2Cl_2/DMF (1:1) (30 ml) hinzugefügt. Nach 30 min bei -10°C ließ man langsam auf RT erwärmen und dampfte das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der Rückstand wurde mit wenig $CHCl_3$ und 5 proz. $KHSO_4$-Lösung 15 min gerührt. Dabei blieb die Hauptmenge an Z-Gln-Phl ungelöst. Diese wurde aus EE unter MeOH-Zusatz in der Kälte kristallisiert. Die Chloroform-Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen, abgedampft und der Rückstand ebenfalls aus EE/MeOH kristallisiert.

Tab. F.1: Charakterisierungsdaten der Aminosäurederivate

	R_F	Fließ-mittel	Schmp.	Lit.-Schmp.	Ref.
Boc-Aib-OH	0.86	I	118°C	119°C	[109]
	0.72	IV			
Ac-Aib-OH	0.62	I	189°C	198-200.5°C	[58]
	0.49	IV		196-198°C	[75]
Boc-Pro-OH	0.83	I	131°C	134-136°C	[119]
	0.72	IV			
Boc-Ala-OH	0.84	I	80°C	80-82°C	[119]
	0.71	IV			
Boc-Val-OH	0.86	I	72°C	72-73°C	[119]
	0.72	IV			
Boc-Gln-OH	0.67	I	117°C	116-118°C	[119]
	0.38	IV			
Z-Gln-OH	0.62	I	136°C	138-139.5°C	[125]
	0.34	IV			
Boc-Glu(OBzl)-OH*	0.87	I	137°C	139-140°C	[121]
	0.79	IV			
HCl x H-Aib-OMe	0.48	I	186°C	190°C	[126]
	0.86	III		179-183°C	[75]
Tos x H-Aib-OBzl	0.66	I	151°C	154-156°C	[75]
	0.91	III			
Phl	0.56	I	90-92°C	91-93°C	[65]
	0.67	III		90-91°C	[64]
	0.34	IV			

* als DCHA-Salz

Ausbeute 2.64 g (64 %); Schmp. 180°C; $[\alpha]_D^{23} = -36.9^\circ$ (c = 1, MeOH); R_F(I) = 0.75, R_F(IV) = 0.70, R_F(V) = 0.63;

$C_{22}H_{27}N_3O_5$ (413.5) ber C 63.90 H 6.58 N 10.16

gef C 64.12 H 6.45 N 10.04

H-Gln-Phl

Z-Gln-Phl (10.80 g, 26.1 mmol) wurde in Methanol/Wasser (4:1) (250 ml) gelöst und in Gegenwart von Pd-Aktivkohle (10 %) (1 g) ohne Säurezusatz hydriert. Nach 2.5 h wurde nochmals etwas Katalysator zugegeben; nach vollständiger Abspaltung der Z-Gruppe (4-5 h) wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgedampft. Das dünnschichtchromatographisch reine Amin wurde ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.
Ausbeute: 6.2 g (85 %); Schmp. 120°C; R_F(I) = 0.46, R_F(III) = 0.49, R_F(IV) = 0.51.

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl

Boc-Glu(OBzl)-OH/DCHA (10.37 g, 20 mmol) wurde in EE (100ml) suspendiert und durch Zugabe von 10 proz. Zitronensäure (150 ml) gelöst. Nach Trocknen der organischen Phase und Abdampfen des Lösungsmittels wurde die ölige Säure in DMF (100 ml) gelöst und mit NMM (2.30 ml, 20 mmol) versetzt. Nach Zugabe von Chlorameisensäureisobutylester (2.66 ml, 20 mmol) bei -20°C wurde H-Gln-Phl (5.59 g) in wenig DMF so zugegeben, daß die Temperatur unter -13°C blieb. Nach 30 min bei -10°C und langsamem selbständigem Aufwärmen auf RT wurde wie üblich aufgearbeitet. Die Kristallisation des pulvrigen, leicht gelblichen Produkts aus EE/Diisopropylether mit einigen Tropfen MeOH (in der Wärme gelöst) lieferte farbloses, dünnschichtchromatographisch reines Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl.
Ausbeute 7.2 g (60 %); Schmp. 135-137°C (Lit. 145°C (aus Ether) [15] und 165°C [16]); $[\alpha]_D^{23}$ = -36.6° (c = 1, MeOH) (Lit.: $[\alpha]_D^{23}$ = -36.2° (c = 1, MeOH) [15] und $[\alpha]_D^{25}$ = -52.5° (c = 0.2, MeOH) [16]); R_F(I) = 0.81, R_F(IV) = 0.77, R_F(V) = 0.69;

$C_{31}H_{42}N_4O_8$ (598.8)	ber	C 62.18	H 7.07	N 9.36
	gef	C 61.76	H 7.12	N 9.16

H-Glu(OBzl)-Gln-Phl x CF_3COOH

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Phl (3.791 g, 6.33 mmol) wurde mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1) (40 ml) versetzt und nach 15 min mit Ether/PE (1:1) gefällt. Das Trifluoracetat (3.743 g, 96 %) zeigte relativ starke Verunreinigungen (ca. 10-20 %); deshalb wurde das Rohprodukt in $CHCl_3$/5 proz. $KHCO_3$-Lösung (10 ml) aufgeschlämmt und die heterogene Lösung abgenutscht. Der Rückstand besteht aus dünnschichtchromatographisch reinem H-Glu(OBzl)-Gln-Phl x CF_3COOH.
Ausbeute 2.07 g (53 %); Schmp. 170°C (Zers.); R_F(I) = 0.54, R_F(III) = 0.65, R_F(IV) = 0.25.

Boc-Aib-Aib-OMe*

Boc-Aib-OH (12.22 g, 60 mmol) wurde bei 60°C in absolutem Toluol (30 ml) gelöst und nach Abkühlen mit NMM (7.02 ml, 60 mmol) versetzt. Bei -5°C wurde Pivalinsäurechlorid (7.34 ml, 60 mmol) zugegeben und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach 1 h bei RT wurde im Vakuum eingedampft. Das ölige gemischte Anhydrid wurde in abs. Toluol (100 ml) aufgenommen und zu einer Mischung aus H-Aib-OMe x HCl (9.24 g, 60 mmol) und NMM (7.02 ml, 60 mmol) in Toluol (100 ml) gegeben. Nach 3 h bei 60°C und anschließendem Rühren bei RT wurde nach 12 h mit EE verdünnt, abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Nach Aufnahme in EE wurde mit 5 proz. $KHCO_3$-, 5 proz. $KHSO_4$- und NaCl-Lösung gewaschen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierte der Dipeptidester langsam unter PE.
Ausbeute: 9.79 g (54 %); Schmp. 86-87°C; R_F(I) = 0.86, R_F(II) = 0.77, R_F(IV) = 0.85, R_F(V) = 0.83 (mit Ninhydrin

---

* analog zur Darstellung von Z-Aib-Aib-OMe [58]

sehr schlecht anfärbbar).

$C_{14}H_{26}N_2O_5$ (302.3)	ber	C 55.63	H 8.67	N 9.26
	gef	C 55.84	H 9.05	N 9.25

HCl x H-Aib-Aib-OMe

Boc-Aib_2-OMe (9.67 g, 32 mmol) wurde in 1.2 N HCl/HAc (60 ml) 20 min gerührt. Anschließend wurde das Hydrochlorid in Ether (150 ml) gefällt. Das über KOH am Hochvakuum getrocknete Produkt wurde direkt weiter zur Synthese eingesetzt.
Ausbeute 6.51 g (85 %); R_F(I) = 0.48, R_F(III) = 0.87, R_F(IV) = 0.31.

Boc-Val-Aib-Aib-OMe

Boc-Val-OH (5.43 g, 25 mmol) in CH_2Cl_2 (20 ml) wurde mit NMM (2.88 ml, 25 mmol) versetzt. Bei etwa -15°C wurde Chlorameisensäureisobutylester (3.37 ml, 25 mmol) zugetropft und nach 15 min eine vorgekühlte Lösung von HCl x H-Aib-Aib-OMe (5.97 g, 25 mmol) und NMM (2.88 ml, 25 mmol) in CH_2Cl_2 (50 ml) langsam zugetropft, ohne daß die Temperatur über -13°C anstieg. Nach 30 min bei -10°C und anschließendem selbständigem Aufwärmen auf RT wurde im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in EE/5 proz. $KHCO_3$-Lösung aufgenommen und die organische Phase noch je dreimal mit 5 proz. $KHSO_4$-, $KHCO_3$- und einmal mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde kristallisiert: Aus EE/PE entstehen lange Nadeln, aus EE/Diisopropylether eher "quader"-förmige, dünnschichtchromatographisch reine Kristalle.
Ausbeute 8.23 g (82 %); Schmp. 87-88°C (Lit. [16]: 140°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -9.4° (c = 1, MeOH) (Lit. [16]: $[\alpha]_D^{25}$ = -17.5° (c = 0.2, MeOH); R_F(I) = 0.85, R_F(II) = 0.69, R_F(IV) = 0.80,

R_F(V) = 0.80; D/L-Bestimmung: 0.27 % D-Val; Kristalldaten s. D.1.2.

$C_{19}H_{35}N_3O_6$ (401.4)	ber	C 56.85	H 8.79	N 10.46
	gef	C 56.83	H 8.79	N 10.33

HCl x H-Val-Aib-Aib-OMe

Boc-Val-Aib_2-OMe (5.32 g, 13.2 mmol) wurden mit 1.2 N HCl/HAc (13 ml) versetzt und das Hydrochlorid nach 30 min mit Ether/PE (1:1) gefällt.
Ausbeute 3.50 g (78 %); R_F(I) = 0.50, R_F(III) = 0.85, R_F(IV) = 0.42.

Darstellung der Dipeptidester Boc-X-Aib-OMe bzw. Boc-X-Aib-OBzl (X = Leu, Val, Gln, Ala, Pro)

Allgemeine Vorschrift:

Boc-X-OH (0.1 mol) wurden in CH_2Cl_2/DMF (1:1) (etwa 100 ml) gelöst und auf -20°C gekühlt. Nach Zugabe von NMM (11.5 ml, 0.1 mol) wurde tropfenweise Chlorameisensäureisobutylester (13.8 ml, 0.1 mol) unter Rühren zugegeben, wobei NMM x HCl ausfiel. Dazu wurde nach 5-10 min tropfenweise unter Einhaltung von -15°C eine vorgekühlte Lösung von HCl x H-Aib-OMe bzw. Tos x H-Aib-OBzl (0.1 mol) und NMM (11.5 ml, 0.1 mol) in CH_2Cl_2/DMF (1:1) (ca. 100 ml) gegeben und 1 h bei -15°C belassen. Nach 1 h bei -5°C wurde bis zum Erreichen der RT weiter gerührt. Dann wurde mit 5 proz. $KHCO_3$-Lösung (ca. 2 ml) noch vorhandenes überschüssiges Anhydrid zerstört und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in EE/5 proz. $KHCO_3$ aufgenommen und je 3 x mit 5 proz. $KHSO_4$-, 5 proz. $KHCO_3$- und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

Boc-Leu-Aib-OBzl

Boc-Leu-OH x 1/2 H_2O (24.03 g, 0.1 mol) wurden nach obiger Vorschrift mit Tos x H-Aib-OBzl (36.54 g, 0.1 mol) zu dünnschichtchromatographisch reinem Boc-Leu-Aib-OBzl gekuppelt.

Ausbeute 35.37 g (87 %); Schmp. 107°C (aus EE/PE) (Lit. [15]: 108-109°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -33.4° (c = 1, MeOH) (Lit. [15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -32.0° (c = 1, MeOH)); R_F(I) = 0.90, R_F(II) = 0.87, R_F(V) = 0.89.

$C_{22}H_{34}N_2O_5$ (406.5)	ber	C 65.00	H 8.43	N 6.89
	gef	C 64.92	H 8.83	N 6.80

Boc-Leu-Aib-OH

Boc-Leu-Aib-OBzl (8.13 g, 20 mmol) wurden in wenig 80 proz. MeOH unter Zusatz von Pd/Aktivkohle (10 %) (300 mg) und Eisessig (500 µl) hydriert. Zur Beschleunigung der Abspaltung wurde auf 30-35°C erwärmt. Nach 5 h war noch eine Spur des Benzylesters auf der Dünnschichtplatte zu sehen. Deshalb wurde nach Abtrennung des Katalysators und Abdampfen des MeOH zwischen möglichst wenig EE und reichlich 5 proz. $KHCO_3$-Lösung verteilt; die wäßrige Phase wurde abgetrennt und bei pH 2.8 (verd. HCl) die dünnschichtchromatographisch reine Dipeptidsäure erschöpfend mit EE extrahiert.

Ausbeute 5.83 g (92 %); Schmp. 142-145°C (Lit. [15]: 128-130°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -30.4° (c = 1, MeOH) (Lit. [15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -23.3° (c = 1, MeOH)); R_F(I) = 0.87, R_F(IV) = 0.74.

$C_{15}H_{28}N_2O_5$ (316.4)	ber	C 56.94	H 8.92	N 8.85
	gef	C 56.79	H 9.21	N 8.65

Darstellung der Tripeptidester Boc-X-Aib-Y-OMe
(X,Y = Leu, Pro; Val, Gly; Ala, Ala)

Allgemeine Vorschrift:

Boc-X-Aib-OH (25 mmol) und HOBt (3.38 g, 25 mmol) wurden in möglichst wenig DMF bei 37-40°C mit DCC (5.158 g, 25 mmol) voraktiviert. Nach 15-20 min wurde eine Lösung des Aminosäureester-hydrochlorids (25 mmol) mit NMM (2.875 ml, 25 mmol) in möglichst wenig DMF zugegeben und 1 h bei der erhöhten Temperatur gekuppelt, dann über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene DCH wurde bei 0°C abgenutscht und anschließend das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde zw. EE und 5 proz. $KHCO_3$ verteilt, die org. Phase je dreimal mit 5 proz. $KHSO_4$ und $KHCO_3$ ausgeschüttelt, mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

Boc-Leu-Aib-Pro-OMe

Boc-Leu-Aib-OH (7.91 g, 25 mmol) wurde nach der allg. Vorschrift nach der DCC/HOBt-Methode mit dem sehr hygroskopischen HCl x H-Pro-OMe (4.14 g, 25 mmol) zu dünnschichtchromatographisch reinem Tripeptidester gekuppelt. Ausbeute 6.41 g (60 %); Schmp. 167°C (aus EE/PE); R_F(I) = 0.84, R_F(II) = 0.76, R_F(V) = 0.82.

$C_{21}H_{37}N_3O_6$ (427.5)	ber	C 59.00	H 8.72	N 9.82
	gef	C 58.95	H 9.16	N 9.82

Boc-Leu-Aib-Pro-OH

Boc-Leu-Aib-Pro-OMe (4.275 g, 10 mmol) wurde in MeOH (70 ml) gelöst und mit 1 N NaOH (30 ml) bei RT verseift. Nach beendeter Reaktion wurde mit verd. HCl neutralisiert und das MeOH abgedampft; bei pH 3 wurde dann mit EE erschöpfend

extrahiert. Die org. Phasen wurden mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Aus einer nicht zu verdünnten methanolischen Lösung kristallisiert die dünnschichtchromatographisch reine Tripeptidsäure bei -20°C.

Ausbeute 3.72 g (90 %); Schmp. 134-135°C (Lit.[15]: 134-137°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -88.3° (c = 1, MeOH) (Lit. [15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -48.4° (c = 1, MeOH)); R_F(I) = 0.80, R_F(IV) = 0.71;

$C_{20}H_{35}N_3O_6$ x CH_3OH (445.5)	ber	C 56.62	H 8.82	N 9.43
	gef	C 56.83	H 9.66	N 9.54

Boc-Val-Aib-OMe

Boc-Val-OH (21.71 g, 0.1 mol) wurde nach der allg. Vorschrift mit 15.36 g HCl x H-Aib-OMe (0.1 mol) über das gemischte Anhydrid zum dünnschichtchromatographisch reinen Dipeptidester gekuppelt.

Ausbeute 22.78 (72 %); Schmp. 140°C (aus EE/PE) (Lit.[16]: 115-118°C); R_F(I) = 0.89, R_F(II) = 0.80, R_F(V) = 0.85;

$C_{15}H_{28}N_2O_5$ (316.4)	ber	C 56.94	H 8.92	N 8.85
	gef	C 56.94	H 9.31	N 8.78

Darstellung der Dipeptidsäuren Boc-X-Aib-OH
(X = Val, Ala, Pro)

Allgemeine Vorschrift:

Boc-X-Aib-OMe (40 mmol) wurde in MeOH (ca. 120 ml) gelöst und bei 37-40°C mit 2 N NaOH (60 ml, 120 mmol) verseift. Nach Ende der Reaktion (2 h) wurde neutralisiert und das MeOH abgedampft. Die wäßrige Lösung wurde bei pH 3 mit EE erschöpfend extrahiert. Nach Waschen der vereinigten org. Phasen mit wenig gesättigter NaCl-Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und aus EE/PE kristallisiert.

Boc-Val-Aib-OH

Boc-Val-Aib-OMe (12.66 g, 40 mmol) wurde nach der allgem. Vorschrift zu dünnschichtchromatographisch reinem Boc-Val-Aib-OH verseift.
Ausbeute 10.4 g (86 %); Schmp. 165°C (aus EE/PE) (Lit. [15]: 133-135°C und [16]: 163-165°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -24.9° (c = 1, MeOH) (Lit. [15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -22.6° (c = 1, MeOH) und [16]: $[\alpha]_D^{25}$ = -32.5° (c = 0.2, MeOH)); R_F(I) = 0.86, R_F(IV) = 0.71.

$C_{14}H_{26}N_2O_5$ (302.4) ber C 55.61 H 8.66 N 9.26
gef C 55.59 H 8.45 N 9.14

Boc-Val-Aib-Gly-OMe

Boc-Val-Aib-OH (7.56 g, 25 mmol) wurde mit HCl x H-Gly-OMe (3.14 g, 25 mmol) mit DCC/HOBt nach der allgem. Vorschrift gekuppelt. Nach üblicher Aufarbeitung wurde ein leicht gelbliches Rohprodukt isoliert, welches durch Überschichten mit PE aus einer EE-Lösung kristallin und dünnschichtchromatographisch rein ausfiel.
Ausbeute 5.88 g (63 %); Schmp. 109-110°C; $[\alpha]_D^{23}$ = -16.9° (c = 1, MeOH); R_F(I) = 0.83, R_F(II) = 0.72, R_F(IV) = 0.84, R_F(V) = 0.84.

$C_{17}H_{31}N_3O_6$ (373.4) ber C 54.68 H 8.37 N 11.25
gef C 54.70 H 8.26 N 11.10

HCl x H-Val-Aib-Gly-OMe

Boc-Val-Aib-Gly-OMe (3.73 g, 10 mmol) wurden mit 1.2 N HCl/HAc (30 ml) versetzt und nach 30 min in gerührten Ether (150 ml) gegossen. Dabei fiel dünnschichtchromatographisch reines HCl x H-Val-Aib-Gly-OMe aus.
Ausbeute 3.02 g (97 %); R_F(I) = 0.42, R_F(III) = 0.75, R_F(IV) = 0.34.

Boc-Gln-Aib-OMe

Boc-Gln-OH (24.63 g, 0.1 mol) wurde nach der allgem. Arbeitsvorschrift mit HCl x H-Aib-OMe (15.36 g) zu dünnschichtchromatographisch reinem Dipeptidester gekuppelt. Boc-Gln-Aib-OMe wurde aus EE/Diisopropylether unter Zusatz von sehr wenig PE kristallisiert.
Ausbeute 21.33 g (61 %); Schmp. 107-109°C; R_F(I) = 0.75, R_F(IV) = 0.74, R_F(V) = 0.69.

$C_{15}H_{27}N_3O_6$ (345.4)	ber	C 52.16	H 7.88	N 12.17
	gef	C 51.96	H 7.90	N 11.96

Boc-Gln-Aib-OH

Boc-Gln-Aib-OMe (14.25 g, 41.2 mmol) in Dioxan (25 ml) wurde bei 40°C innerhalb 1 h mit 2 N NaOH (20.6 ml) versetzt. Nach 4 h wurde neutralisiert und im Vakuum eingeengt. Nach Ansäuern der wäßrigen Phase und Zugabe von EE fiel trotz Anwesenheit der org. Phase nach wenigen Minuten die Dipeptidsäure fast quantitativ aus.
Ausbeute 8.87 g (65 %); Schmp. 184°C (aus EE); (Lit. [15]: 183-184°C und [16]: 176°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -14.6° (c = 1, MeOH) (Lit. [15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -17.0° (c = 1, MeOH) und [16]: $[\alpha]_D^{25}$ = -27.5° (c = 0.2, MeOH)); R_F(I) = 0.73, R_F(IV) = 0.44.

$C_{14}H_{25}N_3O_6$ (331.4)	ber	C 50.74	H 7.60	N 12.67
	gef	C 50.80	H 7.52	N 12.20

Boc-Pro-Aib-OMe

Boc-Pro-OH (21.53 g, 0.1 mol) wurde nach der allgem. Arbeitsvorschrift über das gemischte Anhydrid zu dünnschichtchromatographisch reinem Dipeptidester umgesetzt.
Ausbeute 24.52 g (78 %); Schmp. 80°C (aus EE/PE); R_F(I) = 0.81, R_F(II) = 0.80, R_F(V) = 0.86.

$C_{15}H_{26}N_2O_5$ (314.4) ber C 57.31 H 8.34 N 8.91
gef C 56.81 H 8.96 N 8.88

Boc-Pro-Aib-OH

Boc-Pro-Aib-OMe (12.58 g, 40 mmol) wurde nach der allgem. Vorschrift zu dünnschichtchromatographisch reinem Boc-Pro-Aib-OH verseift.
Ausbeute 11.2 g (93 %); Schmp. 161°C (aus EE/PE); (Lit.[15]: 163-165°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -60.2° (c = 1, MeOH) (Lit.[15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -64.0° (c = 1, MeOH)); R_F(I) = 0.78, R_F(III) = 0.48, R_F(IV) = 0.72.
$C_{14}H_{24}N_2O_5$ (300.4) ber C 55.97 H 8.05 N 9.33
gef C 55.39 H 8.39 N 9.01

4. Darstellung der längeren Peptide

Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OMe, Boc-12-17-OMe

Boc-Leu-Aib-Pro-OH (1.376 g, 3.33 mmol) und HOBt (449 mg, 3.33 mmol) wurden in DMF (10 ml) gelöst. Dann wurde DCC (686 mg, 3.33 mmol) bei 0°C zugegeben und 30 min bei dieser Temperatur voraktiviert. Währenddessen wurde HCl x H-Val-Aib-Aib-OMe (1.350 g, 4.0 mmol) in DMF (10 ml) mit NMM (460 µl) neutralisiert. Nach Zugabe der Aminokomponente in der Kälte wurde 15 h bei RT gerührt, dann wenige Tropfen Eisessig zugegeben und der ausgefallene DCH in der Kälte filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Ölvakuum bei 30°C abgedampft und der Rückstand nach Aufnahme in EE wie üblich gewaschen. Es resultierte nach Trocknung über Na_2SO_4 ein nach Ninhydrin-Anfärbung dünnschichtchromatographisch reines Produkt, welches ohne weitere Reinigung zur Verseifung eingesetzt wurde. Eine kleine Menge wurde an Sephadex LH-20 in wasserfreiem MeOH chromatographiert.

Ausbeute 2.036 g (87 %); R_F(I) = 0.80, R_F(II) = 0.68, R_F(IV) = 0.83, R_F(V) = 0.77.

Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OMe, Boc-14-17-OMe

Boc-Pro-OH (1.20 g, 5.57 mmol) und NMM (640 µl, 5.57 mmol) in CH_2Cl_2/DMF (1:1) (10 ml) wurden bei -20°C mit Chlorameisensäureisobutylester (730 µl, 5.57 mmol) versetzt. Nach 15 min wurde eine vorgekühlte Lösung von HCl x H-Val-Aib-Aib-OMe (1.88 g, 5.57 mmol) und NMM (640 µl, 5.57 mmol) in DMF (10 ml) so langsam zugegeben, daß die Temperatur nicht über -13°C anstieg. Nach 30 min bei -10°C und langsamem, selbständigem Erwärmen auf RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft. Nach üblicher Aufarbeitung wurde dünnschichtchromatographisch reiner Tetrapeptidester erhalten.
Ausbeute 2.0 g (73 %); Schmp. 134-137°C (aus EE/PE) (Lit. [16]: 135°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -49.4° (c = 1, MeOH) (Lit. [16]: $[\alpha]_D^{25}$ = -55.0° (c = 0.2, MeOH)); R_F(I) = 0.84, R_F(II) = 0.74, R_F(V) = 0.80;

ASA: Pro 1.00 (1), Val 1.09 (1), Aib 1.96 (2).

$C_{24}H_{42}N_4O_7$ (498.5) ber C 57.83 H 8.49 N 11.24
gef C 57.72 H 9.04 N 11.00

Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH, Boc-12-17-OH

Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OMe (2.036 g, 2.98 mmol) wurde in MeOH (20 ml) mit 1 N NaOH (6 ml, 6 mmol) verseift. Nach 4 h bei 30-35°C wurde neutralisiert und das MeOH abgedampft. Die wäßrige Lösung wurde bis pH 3 angesäuert, wobei ein Teil der freien Hexapeptidsäure dünnschichtchromatographisch rein ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und das Filtrat mit EE extrahiert. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurden beide

Chargen aus EE bei -20°C umkristallisiert.
Ausbeute 1.482 g (73 %); $[\alpha]_D^{23}$ = -34.5° (c = 1, MeOH);
R_F(I) = 0.75, R_F(III) = 0.42, R_F(IV) = 0.74;

ASA: Leu 1.02 (1), Aib 2.81 (3), Pro 1.01 (1), Val 1.00 (1);
D/L-Bestimmung: 1.66 % D-Leu, 1.41 % D-Pro, 0.76 % D-Val.

$C_{33}H_{58}N_6O_9 \times H_2O$ (700.8) ber C 56.56 H 8.63 N 11.99
gef C 56.66 H 8.90 N 11.67

Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OH, Boc-14-17-OH

Analog zur Darstellung von Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH wurde Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OMe (2.00 g, 4.02 mmol) mit 1 N NaOH (8 ml) in MeOH (20 ml) verseift. Nach Entfernen des Methanols wurde die dünnschichtchromatographisch reine Tetrapeptidsäure bei pH 3 erschöpfend mit EE extrahiert.
Ausbeute 1.86 g (95 %); Schmp. 103-106°C (aus EE/PE);
$[\alpha]_D^{23}$ = -54.9° (c = 1, MeOH); R_F(I) = 0.77, R_F(III) = 0.47,
R_F(IV) = 0.71;
ASA: Pro 1.01 (1), Val 1.03 (1), Aib 2.00 (2).

$C_{23}H_{40}N_4O_7$ (484.5) ber C 57.02 H 8.32 N 11.56
gef C 56.80 H 8.86 N 11.30

Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe, Boc-7-11-OMe

Boc-Gln-Aib-OH (3.31 g, 10 mmol) und HOBt (1.35 g, 10 mmol) in DMF (20 ml) wurden bei 37-40°C mit DCC (2.063 g) voraktiviert. Nach 30 min wurden HCl x H-Val-Aib-Gly-OMe (3.016 g, 9.74 mmol) und NMM (1.120 ml, 9.74 mmol) in DMF (20 ml) zugegeben und 15 h bei RT gerührt. Der ausgefallene DCH wurde in der Kälte filtriert, das Lösungsmittel am Ölvakuum abgedampft und der Rückstand in EE je dreimal mit 5 proz. $KHCO_3$, 5 proz. $KHSO_4$, $KHCO_3$ und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase enthielt

außer dem gewünschten Pentapeptid noch lipophile Verunreinigungen. Gleichzeitig löste sich das gewünschte Pentapeptid merklich in den wäßrigen Waschphasen ohne die in der EE-Phase vorhandene lipophile Verunreinigung. Deshalb wurden sowohl die gesammelten wäßrigen Phasen als auch die organische Hauptfraktion getrennt aufgearbeitet. Die wäßrige Waschphase wurde mehrmals mit frischem EE ausgeschüttelt. Dabei konnte direkt dünnschichtchromatographisch reiner Pentapeptidester erhalten werden.

Die verunreinigte organische Hauptfraktion lieferte 1.573 g Rohprodukt. Dieses wurde an Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm Korngröße, Säulenlänge 60 cm, Durchmesser 3.5 cm) chromatographiert. Mit $CHCl_3$/MeOH (95:5) wurden alle lipophilen Verunreinigungen eluiert (ca. 250 ml) und anschließend mit $CHCl_3$/MeOH/H_2O (65:25:4) Boc-7-11-OMe (976 mg) dünnschichtchromatographisch rein erhalten.
Gesamtausbeute 3.127 g (55 %); $[\alpha]_D^{23} = -10.4^o$ (c = 1, MeOH);
R_F(I) = 0.64, R_F(IV) = 0.74, R_F(V) = 0.66;
ASA: Glx 1.00 (1), Aib 2.01 (2), Val 1.01 (1), Gly 0.91 (1).

$C_{26}H_{46}N_6O_9$ (586.7)	ber	C 53.23	H 7.90	N 14.32
	gef	C 53.34	H 8.55	N 13.96

HCl x H-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe, HCl x H-7-11-OMe

Boc-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe (1.674 g, 2.859 mmol) wurde mit 1.2 N HCl/HAc (11 ml) versetzt und nach 30 min unter Rühren mit Ether gefällt. Das Hydrochlorid wurde abfiltriert und am Ölvakuum getrocknet.
Ausbeute 1.273 g (85 %); R_F(I) = 0.40, R_F(III) = 0.55, R_F(IV) = 0.22.

Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OMe, Boc-2-6-OMe

Boc-Pro-Aib-OH (5.106 g, 17 mmol) und HOBt (2.29 g, 17 mmol) wurden in DMF (25 ml) bei 37-40°C mit DCC (3.508 g, 17 mmol) zur Voraktivierung versetzt. Separat wurde HCl x H-Ala-Aib-Ala-OMe* (5.028 g, 17 mmol) in DMF (150 ml) mit NMM (1.955 ml, 17 mmol) versetzt. Nach einer Voraktivierung von 20 min wurden beide Lösungen vereinigt und 15 h bei RT gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels am Ölvakuum wurde der Rückstand in EE aufgenommen und wie üblich gewaschen. Das dünnschichtchromatographisch reine Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OMe wurde direkt zur Verseifung eingesetzt.

Ausbeute 8.03 g (87 %); R_F(I) = 0.70, R_F(II) = 0.62, R_F(V) = 0.79.

$C_{25}H_{43}N_5O_8$ (541.7)	ber	C 55.43	H 8.00	N 12.93
	gef	C 55.57	H 7.64	N 13.08

Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH, Boc-2-6-OH

Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OMe (8.02 g, 14.8 mmol) wurde in MeOH (150 ml) mit 0.5 N NaOH (60 ml, 30 mmol) verseift. Nach 2.5 h wurde neutralisiert, das MeOH abgedampft, erneut mit 0.5 N NaOH (30 ml, 15 mmol) alkalisch gemacht und dreimal mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde verworfen, die wäßrige Phase wurde bei pH 3 erschöpfend mit EE extrahiert. Nach Trocknung über Na_2SO_4, Abdampfen und Umkristallisieren wurde die nach DC einheitliche, kristalline Pentapeptidsäure erhalten.

Ausbeute 4.60 g (59 %); Schmp. 154°C (aus EE/PE); $[\alpha]_D^{23}$ = -42.6° (c = 1, MeOH); R_F(I) = 0.70, R_F(III) = 0.37, R_F(IV) = 0.62;

ASA: Pro 0.98 (1), Aib 2.04 (2), Ala 2.00 (2);

---

* Darstellung nach [55]

Röntgenstrukturanalyse: Abschn. D.1.1.

$C_{24}H_{41}N_5O_8 \times H_2O$ (545.7) ber C 52.83 H 7.94 N 12.83
gef C 53.10 H 8.10 N 12.48

Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl, Boc-12-20

Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-OH (735 mg, 1.076 mmol) und HOBt (145 mg, 1.076 mmol) wurden in DMF (5 ml) gelöst und mit DCC (222 mg, 1.076 mmol) bei 37-40°C voraktiviert. Nach etwa 20 min wurde TFA x H-Glu(OBzl)-Gln-Phl (686 mg, 1.12 mmol) und NMM (129 µl, 1.12 mmol) in DMF (10 ml) zugegeben. Nach 20 h bei RT wurde das Lösungsmittel am Ölvakuum verdampft und der Rückstand zw. 5 proz. $KHCO_3$-Lösung und EE verteilt. Die org. Phase wurde mit wenig wäßriger Phase wie üblich ausgeschüttelt und 15 min über Na_2SO_4 getrocknet (bei längerem Stehenlassen kann sich das Peptid gallertartig abscheiden).
Rohprodukt 1.20 g (95 %); nach Chromatographie an Sephadex LH-20 in wasserfreiem MeOH wurde dünnschichtchromatographisch reines Boc-12-20 erhalten.
Ausbeute 907 mg (72 %); Schmp. 116-118°C; $[\alpha]_D^{23}$ = -36.0° (c = 1, MeOH); R_F(I) = 0.77, R_F(IV) = 0.74, R_F(V) = 0.71;
ASA: Leu 1.00 (1), Aib 2.86 (3), Pro 1.05 (1), Val 1.00 (1), Glx 2.08 (2), Phl - (1).
Röntgenstrukturanalyse: s. Abschn. D.1.4.

$C_{59}H_{90}N_{10}O_{14} \times H_2O$ (1181.4) ber C 59.98 H 7.85 N 11.86
gef C 60.10 H 7.19 N 11.33

Boc-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl, Boc-14-20*

Analog zur Darstellung von Boc-12-20 wurden Boc-Pro-Val-Aib-Aib-OH (242 mg, 0.5 mmol) und TFA x H-Glu(OBzl)-Gln-Phl (307 mg, 0.5 mmol) unter Verwendung von äquimolaren Mengen HOBt (68 mg), DCC (103 mg) und NMM (60 µl) zu Boc-Pro-Val-Aib_2-Glu(OBzl)-Gln-Phl gekuppelt und wie üblich aufgearbeitet. Die säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH-20 in wasserfreiem MeOH lieferte dünnschichtchromatographisch reines Boc-14-20.

Ausbeute 137 mg (26 %); R_F(I) = 0.77, R_F(IV) = 0.76, R_F(V) = 0.73;

ASA: Pro 1.05 (1), Val 1.00 (1), Aib 2.04 (2), Glx 1.91 (2), Phl - (1).

$C_{49}H_{72}N_8O_{12}$ (965.1) ber C 60.98 H 7.52 N 11.61
gef C 60.77 H 8.12 N 11.53

CF_3COOH x H-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl, CF_3COOH x H-12-20

Boc-12-20 (631 mg, 0.542 mmol) wurde mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1) (5 ml) versetzt und nach 10 min mit Ether/PE (1:2) vollständig gefällt. (Schon eine Reaktionsdauer von 20 min liefert unerwünschte Nebenprodukte.) Die Mutterlauge wurde von dem öligen Trifluoracetat abdekantiert und zur Entfernung der anhaftenden TFA zw. 5 proz. $KHCO_3$ und $CHCl_3$ verteilt. Nach Waschen der org. Phase mit einigen Tropfen gesättigter NaCl-Lösung und Trocknung über $MgSO_4$ wurde CF_3COOH x H-12-20 erhalten.

Ausbeute 440 mg (71 %); R_F(I) = 0.55, R_F(III) = 0.84, R_F(IV) = 0.63.

---

* Für die Darstellung danke ich Herrn Uwe Vetter, Reutlingen, recht herzlich.

Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe,
Boc-2-11-OMe

Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-OH (1.372 g, 2.60 mmol) und HOBt (351 mg, 2.60 mmol) wurden in DMF (10 ml) bei 0°C mit DCC (536 mg) 20 min voraktiviert. Währenddessen wurde HCl x H-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OMe (1.273 g, 2.44 mmol) in der Kälte mit NMM (280 µl, 2.44 mmol) versetzt. Nach Zugabe der Aminokomponente wurde 1 h bei 0°C und 15 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Eisessig (100 µl) wurde am Ölvakuum eingedampft und der Rückstand in EE wie üblich gewaschen. Die gesammelten wäßrigen Phasen wurden nochmals mit CH_2Cl_2 extrahiert und die organische Phase noch je einmal alkalisch, sauer und neutral gewaschen. Die gesammelten org. Phasen ergaben nur leicht durch DCH verunreinigten Dekapeptidester. Dieses Produkt wurde direkt zur Verseifung eingesetzt.
Ausbeute 1.890 g (78 %); R_F(I) = 0.61, R_F(V) = 0.69.

Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OH,
Boc-2-11-OH

Boc-2-11-OMe (1.790 g, 1.80 mmol) in MeOH (40 ml) wurden mit 0.5 NaOH (12 ml, 6 mmol) versetzt. Nach 3 h wurde mit verd. HCl neutralisiert, das MeOH abgedampft und erneut mit 0.2 N NaOH (5 ml) alkalisch gemacht. Durch dreimaliges Ausschütteln mit CH_2Cl_2 wurden lipophile Komponenten entfernt. Anschließend wurde mit verd. HCl auf pH 3 eingestellt und 6 mal mit EE ausgeschüttelt. Die erste EE-Fraktion wurde separat eingedampft und an Sephadex LH-20 mit wasserfreiem MeOH chromatographiert, während die folgenden EE-Extrakte dünnschichtchromatographisch reine Dekapeptidsäure ergaben.
Ausbeute 1.470 g (79 %); Schmp. 150°C (Lit.[15]: 156-158°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -22.2° (c = 1, MeOH) (Lit.[15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -17.5°

(c = 1, MeOH)); R_F(I) = 0.59, R_F(III) = 0.32; R_F(IV) = 0.48;
ASA: Pro 0.86 (1), Aib 4.01 (4), Ala 2.01 (2), Glx 0.94 (1),
Val 1.03 (1), Gly 1.00 (1).
D/L-Bestimmung: D-Pro 1.3 %, D-Ala 1.6 %, D-Glx 1.5 %,
D-Val 1.5 %.

$C_{44}H_{75}N_{11}O_{14}$ (982.2) ber C 53.81 H 7.70 N 15.69
gef C 54.09 H 8.25 N 15.54

Boc-Pro-(Aib-Ala)$_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl, Boc-2-20

Boc-2-11-OH (367 mg, 0.374 mmol) und HOBt (50 mg, 0.374 mmol) wurden in DMF (2 ml) bei 0°C mit DCC (77 mg, 0.373 mmol) 20 min voraktiviert. Danach wurden CF_3COOH x H-12-20 (428 mg, 0.363 mmol) und NMM (42 µl, 0.363 mmol) in DMF (3 ml) zugegeben und 30 h bei RT gerührt. Nach Abzentrifugieren des DCH und Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in $CHCl_3$ aufgenommen, je einmal basisch, sauer und neutral gewaschen und das $CHCl_3$ abgedampft. Das fast farblose Rohprodukt (780 mg) wurde in drei Portionen an Sepahdex LH-20 in wasserfreiem MeOH chromatographiert. Ausbeute 495 mg (67 %), dünnschichtchromatographisch rein; Schmp. 145°C (Lit.[15]: 155-158°C); $[\alpha]_D^{23}$ = -22.2° (c = 1, MeOH) (Lit.[15]: $[\alpha]_D^{23}$ = -11.6° (c = 1, MeOH)); R_F(I) = 0.67, R_F(IV) = 0.76, R_F(V) = 0.72;
ASA: Pro 2.09 (2), Aib 6.96 (7), Ala 2.00 (2), Glx 2.99 (3),
Val 1.84 (2), Gly 0.96 (1), Leu 1.02 (1), Phl - (1);
D/L-Bestimmung: D-Pro 0.7 %, D-Ala 2.0 %, D-Glx 2.1 %,
D-Val 0.7 %, D-Leu 2.1 %, D-Phl 0.5 %;

$C_{98}H_{155}N_{21}O_{25}$ (2027.5) ber C 58.06 H 7.71 N 14.51
gef C 58.40 H 7.28 N 14.11

CF_3COOH x H-Pro-(Aib-Ala)$_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl, CF_3COOH x H-2-20

Boc-2-20 (492 mg, 0.242 mmol) wurden mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1) (4 ml) versetzt und nach 12-15 min mit Ether gefällt. Die Mutterlauge wurde von dem öligen Trifluoracetat abdekantiert und der Rückstand zwischen 5 proz. $KHCO_3$-Lösung (ca. 5 ml) und $CHCl_3$ (ca. 20 ml) verteilt. Die wäßrige Phase wurde noch 2 mal mit $CHCl_3$ nachgewaschen und die vereinigten org. Extrakte mit wenig gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen und kurz über Na_2SO_4 getrocknet. Es wurde dünnschichtchromatographisch reines CF_3COOH x H-2-20 erhalten.
Ausbeute 428 mg (86 %); R_F(I) = 0.41, R_F(III) = 0.67, R_F(IV) = 0.39.

Ac-Aib-Pro-(Aib-Ala)$_2$-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl, Ac-1-20 = ALA(OBzl)

Ac-Aib-OH* (19 mg, 0.13 mmol) und HOBt (18 mg, 0.13 mmol) wurden in DMF (1.5 ml) bei 35°C mit DCC (22 mg, 0.106 mmol) versetzt. Nach 20 min wurden CF_3COOH x H-2-20 (204 mg, 0.10 mmol) und NMM (11.5 µl, 0.10 mmol) in DMF (2 ml) zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Nach Abzentrifugieren des ausgefallenen DCH und Abdampfen des Lösungsmittels im Ölvakuum wurde der Rückstand in $CHCl_3$/5 proz. $KHCO_3$ aufgenommen und die org. Phase noch einmal mit wenig 5 proz. $KHSO_4$-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde die org. Phase ab-

* Darstellung nach [122]

gedampft. Das Rohprodukt (211 mg) wurde an Kieselgel 60 (Fließmittelsystem V) chromatographiert. Durch diese Vorreinigung wurde abgesehen von nicht abgetrenntem DCH ein dünnschichtchromatographisch weitgehend sauberer Alamethicin-γ-benzylester (ALA(OBzl)) erhalten.
Ausbeute 157 mg; R_F(I) = 0.52, R_F(V) = 0.64.

Alamethicin F-30

ALA(OBzl) (160 mg) wurde in 90 proz. wäßrigem MeOH (4 ml) in Gegenwart einer Spatelspitze Hydrierungskatalysator (10 % Pd auf Aktivkohle) bei Normaldruck und 35-40°C 5 h hydriert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde "Roh-Alamethicin" (125 mg) erhalten. Eine anschließende Reinigung durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 in wasserfreiem MeOH befreite das "Roh-Alamethicin" von Resten DCH, ließ aber in der DC mehrere Verunreinigungen (insgesamt ca. 5 %) erkennen. Das nach gelchromatographischer Reinigung erhaltene Alamethicin (110 mg) wurde deshalb nochmals an Kieselgel 60 (Fließmittelsystem V) chromatographiert.
Ausbeute 94 mg (= 50 % über beide Stufen).

Das so erhaltene Alamethicin F-30 wurde zusammen mit weiteren auf gleiche Weise dargestellten Präparationen (insgesamt 180 mg) zur Endreinigung, vor allem zur Abtrennung von Kieselgelresten, an Sephadex LH-20 in wasserfreiem MeOH chromatographiert. Es wurden insgesamt 150 mg dünnschichtchromatographisch reines Alamethicin F-30 gewonnen.
Schmp. 259-264°C (Zers.) (Lit.[15]: synthet. Alamethicin: 249-255°C und [16]: 237°C, nat. Alamethicin F-30: [13 u. dort zit. Lit.]: 275-279°C, 259-260°C)); $[\alpha]_D^{23}$ = -13.4° (c = 1, MeOH) (Lit.[14]: $[\alpha]_D^{23}$ = -5.5° (Rohprodukt, c = 1, Ethanol)); R_F(I) = 0.46, R_F(III) = 0.31, R_F(IV) = 0.57, R_F(V) = 0.40;

ASA: Aib 8.00 (8), Pro 2.06 (2), Ala 2.09 (2), Glx 2.96 (3),
Val 2.05 (2), Gly 0.97 (1), Leu 1.05 (1), Phl - (1);
recovery: 88 %;
D/L-Bestimmung: D-Pro 2.0 %, D-Ala 0.9 %, D-Glx 2.8 %,
D-Val 0.9 %, D-Leu 3.4 %, D-Phl 0.6 %;

$C_{92}H_{150}N_{22}O_{25} \times H_2O$ (1982.4) ber C 55.74 H 7.73 N 15.54
gef C 55.84 H 7.92 N 15.46

s.a. Vergleich mit den in [14-16] beschriebenen Alamethicin-Synthesen: Tab. B.1, S. 38/39.

G. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese des membranmodifizierenden Polypeptidantibiotikums Alamethicin F-30, dessen Konformation und Wirkungsweise wurden beschrieben. Das N-acetylierte Eikosapeptid Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl enthält außer dem C-terminalen Aminoalkohol L-Phenylalaninol (Phl) vor allem acht sterisch gehinderte α-Aminoisobuttersäure (Aib)-Reste.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten bei der Synthese der Tetrapeptidsäure Boc-Pro^{14}-Val-Aib-Aib^{17}-OH gelang unter ständiger Prüfung auf racemisierte Produkte zunächst die Darstellung der Alamethicinvorstufe Boc-2-20, die aus den Segmenten 2-11 und 12-20 in einer Gesamtausbeute von 1.20 g erhalten werden konnte. Alle Kupplungen wurden alternativ mit DCC/HOBt oder durch die Mischanhydridmethode durchgeführt. Nach der letzten Kupplung von Ac-Aib-OH an das 19-Peptid scheiterte der Versuch, die Glu^{18}-γ-Benzylesterschutzgruppe unter leichtem H_2-Überdruck abzuspalten. Die Hydrierung bei Atmosphärendruck mit anschließender Säulenchromatographie an Kieselgel 60 und Sephadex LH-20 lieferte insgesamt 150 mg dünnschichtchromatographisch und HPLC-reines Alamethicin F-30.

Sowohl das ^{13}C-NMR-Spektrum des synthetischen Alamethicins als auch die Spektren von über 20 Zwischenprodukten wurden eingehend diskutiert.

Die helikale Sekundärstruktur der untersuchten Polypeptide gilt als die entscheidende Voraussetzung für ihre spannungsabhängige Ionenleitung durch Membranen. Daher wurden durch Circulardichroismus und ^{13}C-NMR-Spektroskopie (magnetische Nichtäquivalenz der Aib-C_β-Methylgruppen) Konformationsbetrachtungen an ausgewählten Synthesesegmenten durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Winter, Tübingen, konnten insbesondere die Kristallstrukturen zweier längerer Segmente ermittelt werden: Die Pentapeptidsäure Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-OH bildet mit drei aufeinanderfolgenden Typ III-β-Turns fast zwei Windungen einer linksgängigen 3_{10}-Helix; das C-terminale Nonapeptid Boc-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl hat sowohl α- als auch 3_{10}-helikale Bereiche mit z.T. gegabelten intramolekularen H-Brücken.

Einzelporenmessungen in Lipid-Doppelschichtmembranen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Boheim, Bochum, durchgeführt. Synthetisches Alamethicin F-30 zeigt eine außerordentliche Homogenität der fluktuierenden Leitwerte, die bei dem aus Trichoderma viride isolierten Alamethicin wegen dessen Mikroheterogenität (Aminosäurenaustausch) bisher nie beobachtet werden konnte. Die Alamethicinvorstufe Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-Phl bildet ebenfalls stabile Poren. Das lipophile 19-Peptid zeigt jedoch nur 2-3 Leitwerte, die dem achten bzw. neunten Leitwertniveau des Alamethicins entsprechen.

Die antibiotische Aktivität des synthetischen Alamethicins gegen Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus ist identisch mit derjenigen des natürlichen Alamethicins. Die Synthesevorstufe Boc-2-20 zeigte unter identischen Bedingungen im Plattendiffusionstest keine Aktivität gegen die genannten Teststämme.

Synthetisches Alamethicin bewirkt die gleiche Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Guanylat-Cyclase aus Paramecium wie natürliches Alamethicin (Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Schultz, Tübingen).

Alle Analysenergebnisse, spektroskopische Charakterisierungen sowie die voneinander unabhängigen Aktivitätstests sind in voller Übereinstimmung mit der Hauptkomponente F-30 des aus Trichoderma viride isolierten Peptidantibiotikums.

H. LITERATURVERZEICHNIS

[1] P. Meyer und F. Reusser, Experientia 23, 85-86 (1967)

[2] P. Mueller und D.O. Rudin, Nature 217, 713-719 (1968)

[3] J.W. Payne, R. Jakes und B.S. Hartley, Biochem. J. 117, 757-766 (1970)

[4] Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiryushkin und I.V. Kozhevnikova, J. Gen. Chem. USSR 41, 2105-2116 (1971)

[5] zitiert nach: H.-D. Jakubke und H. Jeschkeit; Aminosäuren, Peptide, Proteine, Eine Einführung; Akademie-Verlag Berlin 1982, S. 97

[6] N.C.E. Kendrick, Dissertation, St. Louis, Mo. (1972)

[7] N. Dubischar, Dissertation, Universität Toledo (1976)

[8] G. Jung, N. Dubischar, D. Leibfritz, M. Ottnad, H. Probst und C. Stumpf, in: Peptides 1974, Proc. 13th Eur. Pept. Symp. (Y. Wolman, Hrsg.), J. Wiley, New York 1975, 345-354

[9] G. Jung, N. Dubischar und D. Leibfritz, Eur. J. Biochem. 54, 395-409 (1975)

[10] D.R. Martin und R.J.P. Williams, Biochem. J. 153, 181-190 (1976)

[11] B.F. Gisin, S. Kobayashi und J.E. Hall, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 115-119 (1977)

[12] B.F. Gisin, S. Kobayashi, D.G. Davis und J.E. Hall, in: Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp. (M. Goodman und J. Meienhofer, Hrsg.), Wiley, New York (1977), 215-217

[13] R.C. Pandey, J.C. Cook und K.L. Rinehart, J. Am. Chem. Soc. 99, 8469-8483 (1977)

[14] B.F. Gisin, D.G. Davis, Z.K. Borowska, J.E. Hall und S. Kobayashi, J. Am. Chem. Soc. 103, 6373-6377 (1981)

[15] T.M. Balasubramanian, N.C.E. Kendrick, M. Taylor, G.R. Marshall, J.E. Hall, I. Vodyanoy und F. Reusser, J. Am. Chem. Soc. 103, 6127-6132 (1981)

[16] R. Nagaraj und P. Balaram, Tetrahedron 37, 1263-1270 (1981)

[17] H. Mohr, Dissertation, Technische Universität Berlin, 1977

[18] G. Irmscher und G. Jung, Eur. J. Biochem. 80, 165-174 (1977)

[19] W.A. König und M. Aydin, in: Peptides 1980, Proc. 16th Eur. Pept. Symp. (K. Brunfeldt, Hrsg.), Skriptor, Copenhagen 1980, 711-718

[20] H. Brückner, G.J. Nicholson, G. Jung, K. Kruse und W.A. König, Chromatographia 13, 209-214 (1980)

[21] C. Toniolo, G.M. Bonora, A. Bavoso, E. Benedetti, B. di Blasio, V. Pavone und C. Pedone, Biopolymers 22, 205-215 (1983)

[22] G. Jung, H. Brückner und H. Schmitt, in: Structure and Activity of Natural Peptides (W. Voelter und G. Weitzel, Hrsg.), de Gruyter, Berlin 1981, 75-114

[23] G.R. Marshall in: Intra-Science Chemistry Report, Vol. 5 (N. Kharasch, Hrsg.), Gordon and Breach, New York, 1971, 305-316 (zitiert nach Ref. 21)

[24] A.W. Burgess und S.J. Leach, Biopolymers 12, 2599-2605 (1973)

[25] A.I. McMullen, D.I. Marlborough und P.M. Bayley, FEBS Lett. 16, 278-280 (1971)

[26] G. Jung, N. Dubischar, G. Irmscher, W. Mayr und R. Oekonomopulos, Chemiker-Ztg. 101, 196-201 (1977)

[27] W. Mayr und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1980, 1489-1506

[28] C.M. Venkatachalam, Biopolymers 6, 1425-1436 (1968)

[29] P.Y. Chou und G.D. Fasman, J. Mol. Biol. 115, 135-175 (1977)

[30] N. Shamala, R. Nagaraj und P. Balaram, Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 292-298 (1977)

[31] G.D. Smith, V.Z. Pletnev, W.L. Duax, T.M. Balasubramanian, H.E. Bosshard, E.W. Czerwinski, N.E. Kendrick, F.S. Mathews und G.R. Marshall, J. Am. Chem. Soc. 103, 1493-1501 (1981)

[32] R. Nagaraj und P. Balaram, Acc. Chem. Res. 14, 356-362 (1981)

[33] T. Butters, P. Hütter, G. Jung, N. Pauls, H. Schmitt, G.M. Sheldrick und W. Winter, Angew. Chem. 93, 904-905 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, 889-890 (1981)

[34] H. Schmitt, W. Winter, R. Bosch und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1982, 1304-1321

[35] R.O. Fox und F.M. Richards, Nature 300, 325-330 (1982)

[36] G. Irmscher, Dissertation, Universität Tübingen (1977)

[37] W.G. Bessler, B. Ottenbreit, G. Irmscher und G. Jung, Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 99-105 (1979)

[38] R. Lupp, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

[39] S. Klumpp, G. Jung und J.E. Schultz, Eur. J. Biochem., im Druck

[40] R. Latorre und O. Alvarez, Physiol. Rev. 61, 77-150 (1981) und dort zitierte Literatur

[41] B. Sakmann und G. Boheim, Nature 282, 336-339 (1979)

[42] M. Eisenberg, J.E. Hall und C.A. Mead, J. Membr. Biol. 14, 143-176 (1973)

[43] L.G.M. Gordon und D.A. Haydon, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 270, 433-447 (1975)

[44] G. Boheim und H.-A. Kolb, J. Membr. Biol. 38, 99-150 (1978)

[45] W. Hanke und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta 596, 456-462 (1980)

[46] R. Latorre und J.J. Donovan, Acta Physiol. Scand. Suppl. 481, 37-45 (1980)

[47] M.K. Mathew und P. Balaram, Molec. Cell. Biochem. 50, 47-64 (1983)

[48] J.E. Hall, T.M. Balasubramanian, A. Hing und G.R. Marshall, 8th Amer. Pept. Symposium 1983, Abstr. 7-E

[49] G. Boheim, W. Hanke und G. Jung, Biophys. Struct. Mech. 9, 181-191 (1983)

[50] G. Schwarz und P. Savko, Biophys. J. 39, 211-219 (1982)

[51] R.E. Yantorno, S. Takashima und P. Mueller, Biophys. J. 38, 105-110 (1982)

[52] W. Hanke, C. Methfessel, H.-U. Wilmsen, E. Katz, G. Jung und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta 727, 108-114 (1983)

[53] W. Mayr, Dissertation, Universität Tübingen (1979)

[54] M. Mutter, H.P. Hagenmaier und E. Bayer, Angew. Chem. 83, 883-884 (1971)

[55] R. Oekonomopulos und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1979, 1151-1172

[56] H. Brückner, W.A. König, M. Greiner und G. Jung, Angew. Chem. 91, 508-509 (1979); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 476-477 (1979)

[57] E. Katz, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

[58] M.T. Leplawy, D.S. Jones, G.W. Kenner und R.C. Sheppard, Tetrahedron 11, 39-51 (1960)

[59] F. Weygand und E. Frauendorfer, Chem. Ber. 103, 2437-2449 (1970)

[60] H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatogr. 167, 187-196 (1978)

[61] I.M. Shaw und A. Taylor, J. Chem. Soc. Perkin I, 1979, 1866-1870

[62] H. Determann, J. Heuer, P. Pfaender und M.-L. Reinartz, Liebigs Ann. Chem. 694, 190-199 (1966)

[63] E. Berger, K. Neubert, H. Bang und H.-D. Jakubke, Z. Chem. 22, 379-380 (1982)

[64] G. Jung, W.A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta 433, 164-181 (1976)

[65] H. Seki, K. Koga, H. Matsuo, S. Ohki, J. Matsuo und S. Yamada, Chem. Pharm. Bull. 13, 995-1000 (1965)

[66] E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110-120 (1966)

[67] H. Frank, W. Woiwode, G. Nicholson und E. Bayer, Liebigs Ann. Chem. 1981, 354-365

[68] J.M. Manning und S. Moore, J. Biol. Chem. 243, 5591-5597 (1968)

[69] D.G. Davis und B.F. Gisin, FEBS Lett. 133, 247-251 (1981)

[70] G.R. Marshall und T.M. Balasubramanian, in: Peptides, Proc. 6th Amer. Pept. Symp. (E. Gross und J. Meienhofer, Hrsg.), Rockford, Ill. 1979

[71] G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 507, 470-484 (1978)

[72] R. Oekonomopulos, G. Jung und D. Leibfritz, Tetrahedron 38, 2157-2164 (1982)

[73] H. Brückner und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1982, 1677-1699

[74] G. Jung, H. Brückner, R. Bosch, W. Winter, H. Schaal und J. Strähle, Liebigs Ann. Chem. 1983, 1096-1106

[75] D. Leibfritz, E. Haupt, N. Dubischar, H. Lachmann, R. Oekonomopulos und G. Jung, Tetrahedron 38, 2165-2181 (1982)

[76] R. Bosch, W. Winter, G.M. Sheldrick, H. Schmitt und G. Jung, in Vorbereitung

[77] G. Jung, R. Bosch, E. Katz, H. Schmitt, K.-P. Voges und W. Winter, Biopolymers 22, 241-246 (1983)

[78] A. Aubry, J. Protas, G. Boussard, M. Marraud und J. Neel, Biopolymers 17, 1693-1711 (1978)

[79] G.D. Smith, P.M.D. Fitzgerald, W.L. Duax, T.M. Balasubramanian und G.R. Marshall, Am. Cryst. Assoc. Ser 2, 9, 33 (1981)

[80] W. Mayr, G. Jung und J. Strähle, Liebigs Ann. Chem. 1980, 715-724

[81] E. Benedetti, C. Pedone und C. Toniolo, in: Peptides 1980 (K. Brunfeldt, Hrsg.), Skriptor Copenhagen, 619-624 (1981)

[82] B.V.V. Prasad, N. Shamala, R. Nagaraj, R. Chandrasekaran und P. Balaram, Biopolymers 18, 1635-1646 (1979)

[83] R. Nagaraj, N. Shamala und P. Balaram, J. Am. Chem. Soc. 101, 16-20 (1979)

[84] B.V.V. Prasad und P. Balaram, Biopolymers 21, 1261-1273 (1982)

[85] F.S. Mathews, E.W. Czerwinski, N. Kendrick, H.E. Bosshard, W.H. Vine und G.R. Marshall, Stockholm Symp. Biol. Struct., 44 (1973)

[86] T.S. Cameron, A.W. Hanson und A. Taylor, Cryst. Struct. Comm. 11, 321-330 (1982)

[87] R. Bosch, K.-P. Voges, G. Jung und W. Winter, Acta Cryst. C 39, 481-483 (1983)

[88] R. Bosch, G. Jung, K.-P. Voges und W. Winter, in Vorbereitung

[89] C.P. Rao und P. Balaram, Biopolymers 21, 2461-2472 (1982)

[90] C.M.K. Nair und M. Vijayan, Acta Cryst. B 36, 1498-1500 (1980)

[91] P. van Roey, G.D. Smith, W.L. Duax, T.M. Balasubramanian und G.R. Marshall, Acta Cryst. A 37, Suppl 03.2-07 (1981)

[92] R. Bosch, G. Jung und W. Winter, Acta Cryst. C 39, 776-778 (1983)

[93] E. Benedetti, A. Bavoso, B. di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, M. Crisma, G.M. Bonora und C. Toniolo, J. Am. Chem. Soc. 104, 2437-2444 (1982)

[94] C.P. Rao, N. Shamala, R. Nagaraj, C.N.R. Rao und P. Balaram, Biochem. Biophys. Res. Comm. 103, 898-904 (1981)

[95] A.K. Francis, M. Iqbal, P. Balaram und M. Vijayan, Biopolymers 22, 1499-1505 (1983)

[96] A.K. Francis, M. Iqbal, P. Balaram und M. Vijayan, FEBS Lett. 155, 230-232 (1983)

[97] J.A. Smith und L.G. Pease, CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 315-399 (1980)

[98] R. Bosch, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

[99] E. Benedetti, C. Pedone, C. Toniolo, G. Nemethy, M.S. Pottle und H.A. Scheraga, Int. J. Pept. Prot. Res. 16, 156-172 (1980)

[100] L. Pauling und R.B. Corey, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 37, 235-285 und 729-740 (1951)

[101] J.A. Schellman und P. Oriel, J. Chem. Phys. 37, 2114-2124 (1962)

[102] W. Moffitt, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 42, 736 (1956)

[103] A.D. McLachlan, Proc. Roy. Soc. (London) A 297, 131 (1967)

[104] S.N. Timasheff, R. Townend und L. Mescanti, J. Biol. Chem. 241, 1863-1870 (1966)

[105] H. Rosenkranz und W. Scholtan, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 896-904 (1971)

[106] N. Greenfield und G.D. Fasman, Biochem. 8, 4108-4116 (1969)

[107] Y.-H. Chen, J.T. Yang und K.H. Chau, Biochem. 13, 3350-3359 (1974)

[108] zur Einführung: R.E. Dickerson und I. Geis, Verlag Chemie, Weinheim 1971, 24-33

[109] W. Mayr, R. Oekonomopulos und G. Jung, Biopolymers 18, 425-450 (1979)

[110] R. Oekonomopulos und G. Jung, Biopolymers 19, 203-214 (1980)

[111] R.W. Woody, in: Peptides, Polypeptides and Proteins (E.R. Blout, F.A. Bovey, M. Goodman und N. Lotan, Hrsg.) J. Wiley u. Sons, New York 1974, 338-350

[112] D.M. Urry, M.M. Long, T. Ohnishi und M. Jacobs, Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 1427-1433 (1974)

[113] S. Brahms, J. Brahms, G. Spach und A. Brack, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 74, 3208-3212 (1977)

[114] M. Kawai und G. Fasman, J. Am. Chem. Soc. 100, 3630-3632 (1978)

[115] R. Bosch, G. Jung und W. Winter, Liebigs Ann. Chem. 1982, 1322-1329

[116] H. Schindler und G. Feher, Biophys. J. 16, 1109-1113 (1976)

[117] I. Vodyanoy, J.E. Hall, T.M. Balasubramanian und G.R. Marshall, Biochim. Biophys. Acta 684, 53-58 (1982)

[118] E. van Arx, M. Faupel und M. Brugger, J. Chromatogr. 120, 224-228 (1976)

[119] E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 702, 188-196 (1967)

[120] L. Moroder, A. Hallett, E. Wünsch, O. Keller und G. Wersin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1651-1653 (1976)

[121] F. Drees in Methoden der Org. Chemie (Houben-Weyl-Müller), Bd XV/1, S. 646, Thieme, Stuttgart 1974

[122] H. Brückner und G. Jung, Chromatographia, 13, 170-174 (1980)

[123] K.-H. Deimer, P. Thamm und P. Stelzel, in Methoden der Org. Chemie (Houben-Weyl-Müller), Bd. XV/1, S. 317, Thieme, Stuttgart 1974

[124] L. Zervas, M. Winitz und G.P. Greenstein, J. Org. Chem. 22, 1515-1521 (1957)

[125] E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 97, 2497-2503 (1964)

[126] R. Oekonomopulos, Dissertation, Universität Tübingen (1978)

[127] T. Fujita, Y. Takaishi und T. Shiromoto, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1979, 413-414

[128] K.L. Rinehart Jr., L.A. Gaudioso, M.L. Moore, R.C. Pandey und J.C. Cook Jr., J. Am. Chem. Soc. 103, 6517-6520 (1981)

Danksagung

Neben den bereits im Text erwähnten Personen möchte ich allen Laborkollegen für die stets bereitwillig gewährte Unterstützung danken, insbesondere Herrn Klaus-Peter Voges für die zahlreichen NMR-Messungen.

Den Herren Manfred Marb und Uwe Vetter danke ich sehr herzlich für die einsatzbereite und gewissenhafte Arbeit, die sie im Rahmen ihres Praxis-Semesters geleistet haben.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

H.J. Berthold, H. Bode, F. Bölsing, R. Haul, G. Köbrich, H. Seidel;
E. Bayer, E. Breitmaier, G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Kraus, E. Lindner, I.-P. Lorenz, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Pausewang, F.F. Seelig, J. Strähle, H.-G. Trieschmann, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Heribert Schmitt

7.2.1953	geboren in Frankfurt am Main als Sohn des Versicherungskaufmanns Theo Schmitt und seiner Frau Erna, geb. Wulf
1959 - 1963	Volksschule in Frankfurt am Main
1963 - 1968	Schüler am humanist. Heinrich-von-Gagern-Gymnasium in Frankfurt
1968 - 1971	Besuch des humanist. Friedrichs-Gymnasiums Herford/Westf.
1971/72	Wehrdienst in Dülmen/Westf.
1972 - 1974	Chemie-Studium an der TU Hannover mit Vordiplomsprüfung
1974 - 1978	Fortsetzung des Studiums an der Universität Tübingen
September 1978	mündl. Diplomprüfung
1978/79	Anfertigung der Diplomarbeit: "Synthese und Konformation zweier Undekapeptidmodelle der Alamethicin-Helix" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung
1979 - 1983	Durchführung der experimentellen Doktorarbeit "Totalsynthese des Peptidantibiotikums Alamethicin" unter der Leitung von Prof. Dr. G. Jung, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen
seit WS 81/82	Assistent im Anorganischen und Organischen Praktikum für Biologen (Diplom)